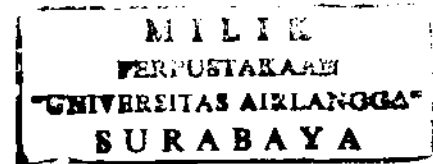


TESIS

**OPTIMASI METODE PENETAPAN KADAR ASETALDEHIDA
DALAM SIRUP FRUKTOSA DENGAN KROMATOGRAFI GAS**



MARIA MONICA SIANITA

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2001**

**OPTIMASI METODE PENETAPAN KADAR ASETALDEHIDA
DALAM SIRUP FRUKTOSA DENGAN KROMATOGRAFI GAS**

TESIS



Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Farmasi
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh :

MARIA MONICA SIANITA
NIM 099612296 M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**
Tanggal 30 Maret 2001

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 30 MARET 2001**

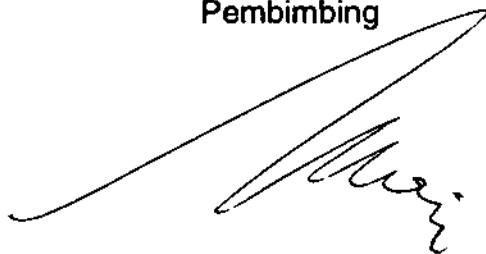
Oleh

Pembimbing Ketua



**Prof Soemadi, Drs, Apt
NIP 130 189 849**

Pembimbing



**Prof Dr H.M. Zainuddin, Drs, Apt
NIP 130 517 154**

Mengetahui

**Ketua Program Studi Ilmu Farmasi
Program Pascasarjana Universitas Airlangga**



**Dr. Widji Soeratri DEA, Apt
NIP 130 611 501**

Telah diuji pada
Tanggal 30 Maret 2001
PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr Achmad Syahrani, Drs, Apt
Anggota : 1. Prof Soemadi, Drs, Apt
2. Prof Dr H.M Zainuddin, Drs, Apt
3. Dr Mulja Hadi Santosa, Drs, Apt
4. Harjana, M Sc, Drs, Apt

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karunia yang telah diberikan sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga saya haturkan kepada Profesor Soemadi, Drs, Apt, Pembimbing Ketua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan, dan saran dalam menyelesaikan tesis ini.

Terima kasih sebesar-besarnya saya haturkan kepada Profesor Dr. H. Muhammad Zainuddin, Apt, Pembimbing yang telah memberikan gagasan, bimbingan, dan saran dalam menyusun dan menyelesaikan tesis ini.

Saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Pendidikan dan Kebudayaan melalui Tim Managemen Program Doktor yang telah memberikan bantuan finansial, sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Penelitian dan tesis ini dapat diselesaikan dengan adanya bantuan serta dukungan dari berbagai pihak dalam berbagai bentuk. Oleh karena itu perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

Rector Universitas Airlangga, Profesor H. Soedarto, dr, DTMH, PhD atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister ini.

Mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Profesor Dr. Soedijono, dr yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program Magister ini.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang dijabat oleh Profesor Dr H. Muhammad Amin, dr, atas kesempatan yang telah diberikan untuk menjadi mahasiswa dan menyelesaikan pendidikan program Magister.

Ketua Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga, Dr Mulja Hadi Santosa, Apt, yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian di Laboratorium Dasar Bersama, dan dengan sabar memberikan bantuan, bimbingan, serta dukungan selama saya melakukan penelitian dan menyelesaikan tesis ini.

Rektor Universitas Negeri Surabaya serta Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya, Profesor Cholik Mutohir, MA, Ph D, serta Hartono, Drs, yang telah memberikan ijin dan kesempatan kepada saya untuk menempuh pendidikan program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Ketua Jurusan Kimia Universitas Negeri Surabaya, Bambang Soegiarto, M Pd., Drs, yang dengan penuh pengertian memberikan kesempatan kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan program Magister saya.

Orang tua, rekan-rekan senasib dan seperjuangan selama menempuh pendidikan program Magister di Universitas Airlangga, maupun rekan-rekan sesama pengajar di Universitas Negeri Surabaya, serta semua pihak yang tak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah banyak memberikan bantuan dan dukungan berupa moril maupun materiil untuk menyelesaikan penelitian dan tesis saya ini.

Semoga hasil penelitian dan tesis yang masih jauh dari sempurna ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

RINGKASAN

Asetaldehida merupakan salah satu zat antara yang dihasilkan pada proses fermentasi yang terjadi dalam sirup fruktosa. Karena diperkirakan berada dalam jumlah runtu dan bersifat “*volatile*” (mudah teratsirikan) maka penetapan kadarnya dilakukan secara kromatografi gas.

Optimasi dilakukan terhadap suhu kolom kromatograf gas yang diprogram karena laju alir serta jenis kolom yang digunakan sudah tertentu. Selektivitas ditentukan berdasarkan perbandingan waktu retensi puncak metanol terhadap puncak asetaldehida dalam standar dan sampel. Suhu optimal ditentukan berdasarkan perhitungan resolusi antara puncak asetaldehida dan puncak terdekat (metanol) dalam standar dan sampel. Terhadap proses distilasi dilakukan penentuan rekovert hasil distilasi yang dianalisis dengan kromatograf gas untuk mengantisipasi hilangnya asetaldehida selama proses distilasi.

Dari hasil penelitian diperoleh suhu kolom kromatografi gas yang optimal adalah suhu terprogram dengan suhu awal sebesar 40 °C dengan kenaikan 40°C/menit setelah 4 menit, sehingga mencapai suhu akhir 200 °C. Batas deteksi yang diperoleh sebesar 2,5ng/μl batas kuantitasi sebesar 8,3ng/μl. Linieritas diperoleh pada rentang konsentrasi 5,05 ppm sampai 1.010,00 ppm dengan persamaan regresi $Y = 152,99 + 233,09X$ dan koefisien korelasi r sebesar 0,99998. Persen rekovert sebesar $53.67\% \pm 1.74$ diperoleh sebagai hasil distilasi dengan air, dan sebesar $46.96\% \pm 1.76$ sebagai hasil distilasi dengan asam. Hasil ini diuji dengan uji-t satu sampel, menghasilkan akurasi yang kurang memenuhi syarat, disebabkan suhu ruang tempat melakukan distilasi di atas suhu titik didih asetaldehida, sehingga hilangnya asetaldehida pada saat pengambilan “receiver” tak dapat dihindari. Ini merupakan salah satu keterbatasan penelitian. Penyuntikan analit sebanyak 1 μl dari siring yang berkapasitas 10 μl merupakan keterbatasan ke dua. Presisi cukup baik, dinyatakan dengan koefisien variasi sebesar 1,74% untuk hasil distilasi dengan air

dan 1,76% untuk hasil distilasi dengan asam. Kadar asetaldehida dalam distilat hasil distilasi dengan air lebih besar daripada dalam distilat hasil distilasi dengan asam, baik standar maupun sampel. Hal ini dinyatakan melalui uji-t satu pasang di mana harga t-hitung lebih besar daripada t-tabel.

ABSTRACT

Acetaldehyde can be found as a "by product" of fermentation processes in high fructose syrups. Due to its volatile properties, it is determined by using capillary gas chromatography. The method of distillation was used for sample preparation. Because the carrier rate and the column type of the gas chromatograph was fixed, optimizing has been done toward the column temperature.

The selectivity was evaluated by comparing the retention time of acetaldehyde and methanol in standard solution and in samples, then the column temperature was optimized by computing the resolution between the peak of acetaldehyde and the nearest peak (methanol).

The optimum column temperature was programmed with initial temperature 40°C for four minutes, increasing by 40°C/ minute to 200°C. A detection limit and a quantitation limit of acetaldehyde in distillate of 2.50 ng/μl and 8.33 ng/μl respectively can be obtained. The calibration curve was linear from 5.05 ppm to 1,010.00 ppm, with the regression line $Y = 152,99 + 233,09 X$ and the coefficient r was 0,99998. The percent recovery for distillation with water was $53.67 \% \pm 1,74$. For distillation with acid was $46.96 \% \pm 1.76$. Those were then evaluated using t-test, result in poor accuracy for the distillation processes. This could be caused by the volatility of acetaldehyde, where its boiling point is below the room temperature, or by the usage of 10μl microsyringe whereas only about 1.0 μl was injected to the injector. The precision was good with the relative standard deviation of 1.74% dan 1.76% for the distillation with water and

with acid respectively. The concentration of acetaldehyde in syrups distilled with water were found from 289.78 $\mu\text{g/g}$ to 449.38 $\mu\text{g/g}$ and those distilled with water were found from 232.07 $\mu\text{g/g}$ to 428.89 $\mu\text{g/g}$ for the distillation with acid. By using paired samples t-test it can be concluded that the concentration of acetaldehyde found in the distillates distilled with water were significantly greater than that distilled with acid

Another research should be done to find a better recovery. and accuracy

Key words : *acetaldehyde, high fructose syrups, distillation, gas chromatography, optimizing, validation, resolution, recovery*

DAFTAR ISI

Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan terima kasih	vi
Ringkasan	viii
Abstrak	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN/ISTILAH	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang masalah	1
1.2 Rumusan masalah	4
1.3 Tujuan penelitian	5
1.4 Manfaat penelitian.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Tinjauan mengenai asetaldehida	7
2.1.1 Sifat-sifat asetaldehida	7
2.1.2 Pembuatan asetaldehida	9
2.1.3 Kegunaan asetaldehida	11
2.1.4 Pengaruh asetaldehida terhadap kesehatan	11
2.2 Tinjauan mengenai sirup fruktosa	13
2.2.1 Sifat-sifat sirup fruktosa	14
2.2.2 Pembuatan sirup fruktosa	15
2.2.3 Kegunaan sirup fruktosa	18
2.3 Tinjauan mengenai proses fermentasi	19
2.3.1 Tinjauan umum	19

2.3.2	Fermentasi alkoholik dan asam laktat	19
2.4	Tinjauan mengenai kromatografi gas	22
2.4.1	Gas pembawa	23
2.4.2	Gerbang suntik	24
2.4.3	Kolom	24
2.4.4	Detektor	25
2.4.5	Perekam dan pengolah data	26
2.5	Tinjauan mengenai validasi metode	26
2.5.1	Selektivitas	27
2.5.2	Batas deteksi dan batas kuantitasi	28
2.5.3	Linieritas dan rentang	30
2.5.4	Akurasi	30
2.5.5	Presisi	31
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL	32
BAB 4	METODE PENELITIAN	35
4.1	Bahan-bahan penelitian	35
4.1.1	Sirup fruktosa	35
4.1.2	Larutan asetaldehida standar	35
4.1.3	Larutan asam fosfat	35
4.1.4	Asam sitrat anhidrida	35
4.1.5	Gas nitrogen	35
4.1.6	Aquabidest	35
4.2	Peralatan penelitian	35
4.2.1	Peralatan distilasi	35
4.2.2	Peralatan kromatograf gas	37
4.3	Lokasi dan waktu penelitian	38
4.4	Prosedur penelitian	38
4.4.1	Persiapan	38
4.4.2	Distilasi larutan asetaldehida standar	40
4.4.3	Distilasi sampel sirup fruktosa	41
4.4.4	Analisis dengan kromatografi gas	42

4.5	Analisis data	43
4.5.1	Penentuan selektivitas dan optimasi	43
4.5.2	Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi	44
4.5.3	Penentuan linieritas	45
4.5.4	Penentuan akurasi dan presisi	45
4.5.5	Penentuan kadar asetaldehida dalam sirup	46
BAB 5	ANALISIS HASIL PENELITIAN	47
5.1	Penentuan selektivitas dan optimasi suhu	47
5.2	Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi	49
5.3	Penentuan linieritas	53
5.4	Penentuan akurasi dan presisi	54
5.5	Penetapan kadar asetaldehida dalam sirup	57
BAB 6	PEMBAHASAN	60
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN	65
DAFTAR PUSTAKA.....		67
LAMPIRAN		71

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1	Data waktu retensi asetaldehida dan metanol standar pada berbagai suhu kolom	47
Tabel 5.2	Data waktu retensi puncak asetaldehida dan puncak terdekat dalam distilat sampel	47
Tabel 5.3	Data hasil perhitungan selektivitas dan resolusi	48
Tabel 5.4	Data kromatogram tinggi puncak rata-rata (Y) terhadap konsentrasi (X)	49
Tabel 5.5	Data kromatogram luas area (Y) terhadap konsentrasi (X)	53
Tabel 5.6	Data perbandingan konsentrasi sebelum dan setelah distilasi untuk perhitungan persen rekoveri	56
Tabel 5.7	Data hasil penimbangan sampel sirup fruktosa ..	58
Tabel 5.8	Data konversi luas area (Y) terhadap konsentrasi asetaldehida (X) dalam sampel	58
Tabel 5.9	Data hasil perhitungan kadar asetaldehida dalam sampel sirup fruktosa yang diteliti	59

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Skema proses fermentasi homolaktat dan homoetanolat	21
Gambar 2.2	Skema proses fermentasi secara umum	21
Gambar 4.1	Rangkaian peralatan distilasi	37
Gambar 4.2	Peralatan kromatograf gas HP 5890 series II	38
Gambar 4.3	Kotak pendingin tempat larutan yang akan dianalisis	40
Gambar 5.1	Kurva tinggi puncak asetaldehida terhadap konsentrasi	50
Gambar 5.2	Kromatogram asetaldehida konsentrasi rendah untuk penentuan "slope"	51
Gambar 5.3	Kromatogram blanko untuk penentuan batas deteksi serta batas kuantitasi	52
Gambar 5.4	Kurva regresi luas area terhadap konsentrasi untuk penentuan linieritas	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1a Kromatogram untuk penentuan selektivitas dan optimasi suhu	71
Lampiran 1b Kromatogram pengujian kemurnian puncak asetaldehida pada suhu kolom 40°C	72
Lampiran 2 Kondisi kromatograf gas dan pengaturan parameter integrator yang digunakan dalam penelitian	73
Lampiran 3 Analisis regresi untuk penentuan "slope" batas deteksi dan batas kuantitasi	74
Lampiran 4 Analisis regresi dengan tabel analisis varian untuk penentuan linieritas	75
Lampiran 5 : Analisis hasil persen rekoveri dengan uji-t satu sampel	76
Lampiran 6 : Analisis perbandingan % rekoveri hasil distilasi dengan air dan hasil distilasi dengan asam dengan uji- t satu pasang	77
Lampiran 7 Perhitungan luas area rata-rata untuk penetapan kadar asetaldehida dalam distilat sampel	78
Lampiran 8 : Analisis perbandingan kadar asetaldehida dalam sampel sirup fruktosa hasil distilasi dengan air dan dengan asam dengan uji-t satu pasang	79
Lampiran 9 Kromatogram beberapa sampel yang digunakan dalam penelitian	80
Lampiran 10 Daftar tabel distribusi-t dan nilai kritis F	81

DAFTAR SINGKATAN / ISTILAH

1. α :
1. Taraf signifikansi pada kurva normal
2. Perbandingan waktu tambat puncak 1 dan 2.
2. DPN : Detector Pengionan Nyala
3. EMP : Embden-Meyerhof Parnas :
jalur proses fermentasi Glukosa \rightarrow Asam Piruvat
4. FID : Flame Ionization Detector (= DPN)
5. HFS : High Fructose Syrups (sirup fruktosa)
6. KV : Koefisien variasi (standar deviasi relatif)
7. $N_{p-p}(N_0)$: Noise (= derau) :
puncak-puncak penyuntikan blanko
8. ppm : part per million (bagian per juta)
9. Rate : Kecepatan naiknya suhu kolom ($^{\circ}\text{C}/\text{menit}$)
10. Slope : Kemiringan kurva regresi (y/x)
11. UHP : Ultra High Purity (kemurnian sangat tinggi)

BAB 1

PENDAHULUAN



1.1 Latar belakang masalah

Asetaldehida sering ditemukan sebagai hasil antara proses fermentasi yang terjadi dalam bahan-bahan makanan atau minuman yang mengandung gula. Salah satu bahan makanan atau minuman yang mengandung gula tersebut adalah sirup fruktosa yang banyak digunakan dalam pembuatan produk-produk makanan atau minuman rendah kalori. Sirup ini terutama digunakan oleh pabrik-pabrik minuman ringan bersoda (*"soft drinks"*) seperti Coca cola, Pepsi cola, dan sebagainya (Tjokroadikoesoemo, 1986). Asetaldehida ini juga ditemukan pada produk-produk minuman dengan rasa jeruk atau anggur, bersama-sama dengan metanol dan etanol (Lund, et al, 1981), dan pada minuman-minuman yang mengandung alkohol (etanol) (Mc Garrity, et al 1997). Asetaldehida ini bahkan ditemukan dalam air mineral yang disimpan dalam botol-botol yang terbuat dari *"Polyethylene Terephthalate"* (PET) (Nijssen, et al., 1996).

Keberadaan asetaldehida sebagai hasil antara tidak diharapkan karena mempengaruhi rasa dan bau dari produk-produk tersebut (Curtis, 1998, Nijssen, et al., 1996). Selain itu asetaldehida dalam tubuh bereaksi dengan hemoglobin (Hb) dalam darah sehingga mengakibatkan sirkulasi oksigen ke otak berkurang (Tsuboi, et al, 1981). Senyawa ini juga memiliki kecenderungan bereaksi dengan vitamin B1 (*Thiamin*)

(Dreyfus dan Victor, 1971) dan dengan "*Nicotinamide Adenosin Diphosphat*" (NAD), suatu bentuk ko-enzym dari vitamin B3 (*Niacin*) (Clearly, 1986) sehingga menimbulkan defisiensi vitamin tersebut. Karena itu perlu dilakukan penelitian untuk penetapan kadar asetaldehida tersebut.

Penentuan kadar asetaldehida sebagai pencemar dalam udara telah banyak dilakukan dengan berbagai metode. Sedangkan penentuan asetaldehida bersama-sama senyawa lain dalam makanan atau minuman umumnya dilakukan dengan menggunakan kromatografi gas, misalnya metode penentuan senyawa karbonil dalam air minum dengan cara derivatisasi dengan menggunakan kromatografi gas kolom kapiler dan detektor penangkap elektron ("*electron capture detector*, atau ECD) oleh Munch, et al (1998), analisis aldehida dalam air dengan kromatografi gas / spektrometri massa (GC/MS) yang dilengkapi dengan "*headspace*" (Sugaya, et al, 2000), penentuan senyawa-senyawa yang bersifat "*volatile*" (mudah menguap) dalam bir dengan cara kromatografi gas dengan menggunakan "*headspace*" (Mc Garrity, et al, 1997), penentuan metanol, etanol, dan asetaldehida dalam "*citrus*" (jeruk) dengan kromatografi gas dan metode preparasi distilasi dan ekstraksi dengan "*headspace*" (Lund dan Dinsmore, 1981), prosedur penetapan kadar asetaldehida dalam sirup fruktosa dengan kromatografi gas yang disusun oleh The Coca-Cola Company (1985), penentuan asetaldehida dalam air mineral yang disimpan dalam botol-botol yang terbuat dari "*polyethylene terephthalat*" (PET) (Nijssen, et al 1996), dan sebagainya.

Penelitian-penelitian tersebut umumnya menggunakan teknik "*headspace*" sebagai pelengkap kromatografi gas yang digunakan, sedangkan peralatan kromatograf gas yang tersedia di tempat peneliti melakukan penelitian tidak dilengkapi dengan "*headspace*". Karena penelitian ini tidak bertujuan komersial, maka perlu diupayakan penetapan kadar asetaldehida tersebut dengan menggunakan peralatan yang ada, dan memodifikasi prosedur-prosedur yang ditemukan.

Asetaldehida sebagai hasil antara proses fermentasi dalam sirup fruktosa, dapat dibebaskan dari sirup dengan adanya panas, namun harus segera didinginkan kembali agar uap yang terjadi tidak hilang di udara. Metode preparasi yang paling sesuai dengan kondisi ini menurut logika adalah metode distilasi dengan menggunakan aliran air dingin untuk mendinginkan kondenser. Karena asetaldehida tersebut sangat reaktif dan mudah teroksidasi, maka untuk mengusir oksigen yang ada dalam peralatan distilasi tersebut digunakan aliran gas nitrogen (N_2) dengan kualitas "*ultra high purity*" (UHP) sebelum distilasi dilakukan.

Karena penelitian ini dilakukan dengan memodifikasi beberapa peralatan dan juga kondisi pada prosedur-prosedur yang ada, maka perlu dioptimasi dan diuji validitasnya. Dalam kromatografi gas umumnya ada tiga parameter yang dapat dioptimasi, yaitu suhu kolom (oven), laju alir gas pembawa, serta jenis kolom. Karena situasi dan kondisi di mana jenis kolom yang digunakan serta laju alir gas pembawa sudah tertentu, maka dilakukan optimasi terhadap suhu kolom (oven) pada awal penelitian, sekaligus menentukan selektivitasnya. Kemudian dilakukan pengujian

validasi yang meliputi penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi, penentuan linieritas, serta penentuan akurasi dan presisi terhadap larutan asetaldehida standar, baru kemudian dianalisis dengan cara kromatografi gas untuk penetapan kadar asetaldehida dalam sampel sirup fruktosa yang digunakan dalam penelitian ini.

Bertolak dari latar belakang permasalahan tersebut maka dipilih judul penelitian, "Optimasi metode penetapan kadar asetaldehida dalam sirup fruktosa dengan kromatografi gas".

1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan judul penelitian dan latar belakang masalah maka dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

- 1.2.1 Pada suhu kolom berapa yang optimum untuk penetapan kadar asetaldehida dengan kromatografi gas ?
- 1.2.2 Berapa harga batas deteksi dan batas kuantitasi metode yang digunakan dalam penelitian ini ?
- 1.2.3 Sejauh mana linieritas, presisi, serta akurasi metode yang digunakan dalam penelitian ini ?
- 1.2.4 Berapa kadar asetaldehida yang terdapat dalam sampel sirup fruktosa hasil distilasi dengan air dan dengan asam serta apakah ada perbedaan kadar dari kedua macam suasana distilasi tersebut?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Tujuan umum penelitian ini adalah menentukan kondisi optimum yang digunakan pada penetapan kadar asetaldehida dengan kromatografi gas.

1.3.1 Tujuan khusus

Sesuai dengan rumusan masalah maka tujuan khusus penelitian ini adalah :

- a. Menentukan suhu kolom kromatograf gas yang optimum baik terhadap larutan standar maupun terhadap distilat sampel
- b. Menentukan harga parameter analisis yang meliputi batas deteksi, batas kuantitasi, linieritas, akurasi, serta presisi metode analisis yang digunakan dalam penelitian ini.
- c. Menentukan kadar asetaldehida dalam sampel hasil distilasi dengan air dan dengan asam serta menentukan apakah ada perbedaan hasil dari kedua macam distilasi tersebut.

1.4 Manfaat penelitian

Keberhasilan ataupun kelemahan penelitian ini dapat dijadikan dasar untuk mengembangkan metode yang sesuai untuk penetapan kadar asetaldehida dalam produk-produk makanan atau minuman lain, khususnya di Indonesia, di mana kondisi suhu ruang berada di atas suhu titik didih asetaldehida tersebut.

Karena asetaldehida merupakan hasil antara proses fermentasi, maka penelitian ini dapat dikembangkan untuk meneliti senyawa-senyawa lain yang dihasilkan pada proses fermentasi bahan-bahan yang mengandung gula atau karbohidrat

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan mengenai Asetaldehida .

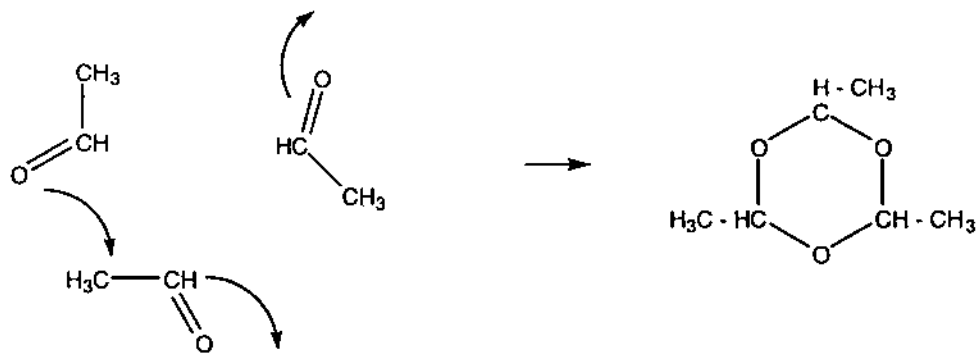
2.1.1 Sifat-sifat asetaldehida

Asetaldehida atau Etanal merupakan senyawa ke dua dari golongan aldehida dengan rumus molekul CH_3CHO , bobot molekul 44,05 dengan komposisi C sebesar 54,53%, H sebesar 9,15%, dan O sebesar 36,32%, densitas antara 0,779 – 0,780, titik didih sebesar 20,8 – 21 °C, dan titik leleh sebesar –123,5 °C. Merupakan cairan yang mudah terbakar dan sangat reaktif, dapat bercampur dengan air, alkohol, eter, dan pelarut-pelarut organik. Memiliki bau tajam yang spesifik, namun pada konsentrasi rendah berbau seperti buah-buahan (Winhloz, 1983; Othmer 1978)

Asetaldehida merupakan senyawa yang sangat reaktif .Karena itu harus disimpan dalam keadaan dingin dan didinginkan sebelum dibuka. Reaksi asetaldehida dengan berbagai senyawa kimia umumnya sama seperti pada golongan aldehida yang lain, misalnya dengan pereaksi Fehling, Tollens, Schiff, dan sebagainya, yang sering digunakan dalam analisis kualitatif. Pengujian yang spesifik untuk asetaldehida menurut Winholz (1983) dengan larutan potasium hidroksida dan iod (uji iodoform) yang akan menghasilkan kristal berwarna kuning

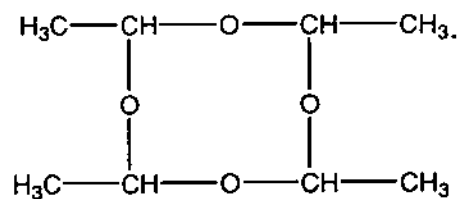
Asetaldehida dapat mengalami reaksi polimerisasi jika direaksikan dengan asam sulfat :

- a. Dengan setetes asam sulfat pekat akan terbentuk paraldehida, bentuk trimer dari asetaldehida dengan struktur siklis dan tidak memiliki sifat pereduksi sebagaimana halnya asetaldehida.



Paraldehida ini merupakan cairan berbau manis dengan titik didih 128 °C dan digunakan sebagai hipnotik

- b. Jika direaksikan dengan beberapa tetes asam sulfat pada 0°C akan menghasilkan bentuk tetramer dari asetaldehida, yaitu metaldehida dengan struktur sebagai berikut :



Metaldehida merupakan padatan putih dengan titik leleh 246 °C. Senyawa ini digunakan sebagai bahan bakar padat dalam lampu-lampu kecil .

Kedua macam polimer tersebut dapat diubah kembali menjadi asetaldehida jika didistilasi dengan asam sulfat. (Winholz, 1983; Othmer, 1978)

2.1.2 Pembuatan Asetaldehida

Asetaldehida terbentuk sebagai senyawa antara (intermediate) dalam proses fermentasi alkoholik dari glukosa dan umumnya terdapat dalam anggur dan buah-buahan yang memiliki rasa masam sebelum masak (Bahl dan Bahl, 1981; Othmer, 1978). Asetaldehida juga merupakan hasil samping pada proses pembuatan minuman keras yang mengandung etanol seperti pada proses pembuatan bir, rum, anggur, dan sebagainya (Mc Nair dan Bonelli, 1988)

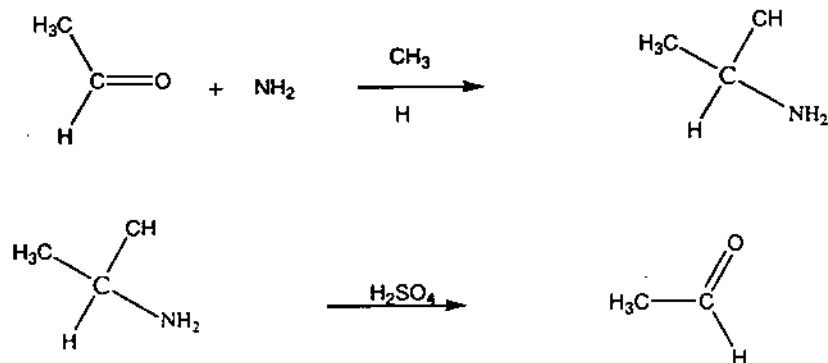
Pembuatan asetaldehida dapat dilakukan dengan berbagai cara. Metode yang paling sederhana adalah pembuatan asetaldehida dari paraldehida dengan cara distilasi sebagaimana dikemukakan oleh Vogel (1968). Metode ini juga dapat digunakan untuk pemurnian larutan standar asetaldehida.

Bahl dan Bahl (1981) dan Winholz (1983) menggolongkan metode pembuatan asetaldehida ini ke dalam dua kelompok besar, yaitu pembuatan di laboratorium dan pembuatan secara komersial.

Pembuatan asetaldehida di laboratorium dilakukan dengan cara mengoksidasi etanol dengan menggunakan campuran sodium dan potassium dikromat dengan pengoksidasi asam sulfat. Asetaldehida yang diperoleh direaksikan dengan amonia menjadi asetaldehida-amonia,

kemudian dikeringkan dan didistilasi dengan asam sulfat encer. Hasilnya ditampung dalam wadah yang didinginkan oleh potongan-potongan es batu.

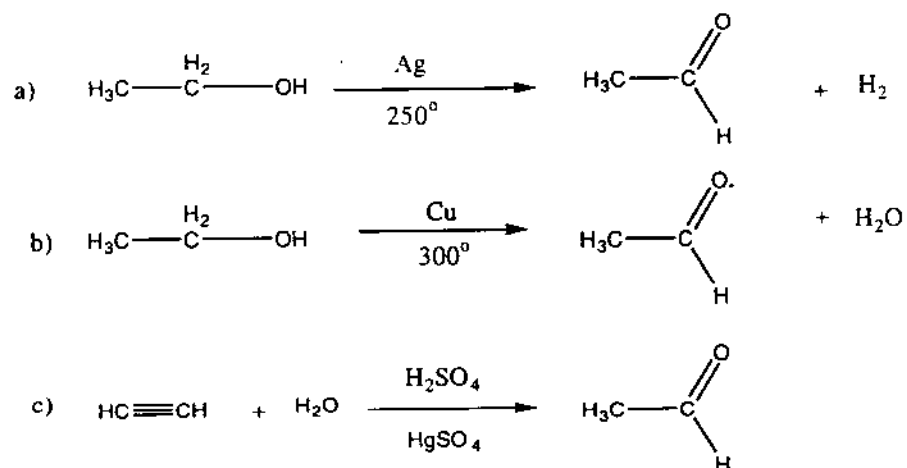
Persamaan reaksinya adalah sebagai berikut :



Pembuatan asetaldehida secara komersial dapat dilakukan dengan tiga cara yaitu :

- Oksidasi katalitik dari etanol dengan udara dengan katalis perak pada suhu 250°C.
- Melewatkan uap etanol di atas tembaga pada suhu 300°C
- Hidrasi dari asetilena dengan katalis garam merkuri dan H₂SO₄

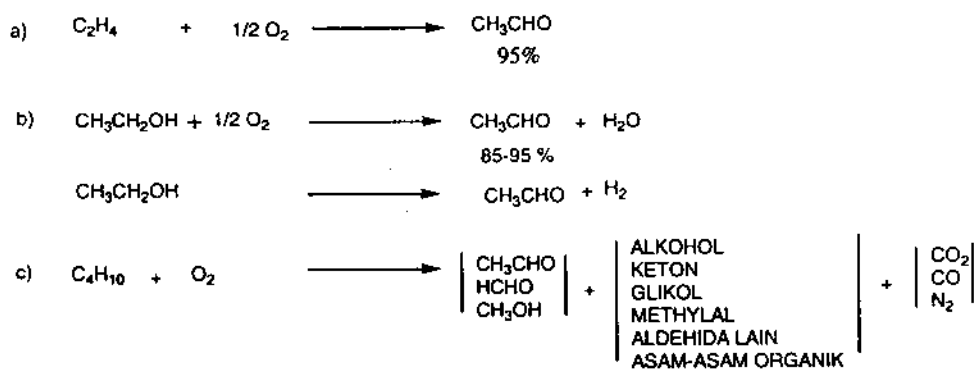
Reaksi-reaksi pembentukannya adalah sebagai berikut :



Sedangkan menurut Faith, et all (1975) pembuatan asetaldehida dalam industri dilakukan dengan tiga macam cara, yaitu

- a. Oksidasi langsung dari etilena
- b. Oksidasi fase uap atau dehidrogenasi dari etanol
- b. Oksidasi fase uap dari butana

Persamaan reaksi-reaksi tersebut di atas adalah sebagai berikut



2.1.3 Kegunaan Asetaldehida

Asetaldehida memiliki aspek-aspek ekonomi dan komersial (Faith, et al, 1975). Senyawa ini digunakan dalam pembuatan paraldehida, asam asetat, butanol dan berbagai senyawa organik lain, parfum, plastik, karet sintetis, zat pewarna anilin, penyedap rasa (*flavor*) dan sebagainya. Juga untuk mengeraskan serat-serat gelatin. (Winholz, 1983; Bahl dan Bahl, 1981; Othmer, 1978).

2.1.4 Pengaruh Asetaldehida terhadap Kesehatan

Di samping memiliki aspek ekonomi dan komersial, asetaldehida ternyata juga berbahaya terhadap kesehatan. Menurut label pada botol

standar Asetaldehida yang berasal dari Merck, senyawa ini dapat menimbulkan iritasi pada mata dan kulit, juga memiliki sifat narkotik. Dosis asetaldehida yang terlalu tinggi dapat menimbulkan kematian karena paralisis saluran pernapasan (Winholz, 1983). Asetaldehida juga merupakan neurotoksin umum yang masuk ke dalam tubuh manusia melalui konsumsi alkohol, serta dapat terbentuk dalam usus sebagai akibat proses fermentasi gula oleh sejenis kandida dalam usus yang pertumbuhannya menjadi tak terkendali akibat penggunaan antibiotika, dan obat-obatan dari golongan kortison/prednison, serta malnutrisi. Kondisi ini dikenal sebagai "*yeast syndrome*" (South, 1997). Asetaldehida yang terbentuk dalam usus ini kemudian bereaksi dengan sel-sel darah merah dan protein, kemudian mengikuti aliran darah sampai ke otak.

Penelitian dari Tsuboi, et al (1981) menunjukkan bahwa asetaldehida ini membentuk senyawa yang stabil dengan hemoglobin dalam sel-sel darah merah, sehingga mengurangi kemampuan sel-sel darah merah tersebut untuk mengikat dan mengalirkan oksigen ke sel-sel tubuh, terutama ke otak.

Asetaldehida juga memiliki kecenderungan untuk bereaksi dengan vitamin B1 (*Thiamin*) yang dikenal sebagai vitamin untuk saraf sebagaimana dilaporkan oleh Dreyfus dan Victor (1971), sehingga menimbulkan defisiensi vitamin tersebut dan mengakibatkan timbulnya gejala yang dikenal sebagai "*Wernicke-Korsakoff syndrome*" yang ditandai oleh gangguan mental, daya ingat yang buruk, koordinasi otot-otot saraf yang buruk, dan gangguan penglihatan.

Asetaldehida juga bereaksi dengan NAD, suatu bentuk koenzym dari vitamin B 3 (*Niacin*). NAD ini berfungsi mengaktifkan kerja enzim alkohol dehidrogenase dan aldehyd dehidrogenase yang dapat memecah alkohol dan asetaldehida, dengan bantuan mineral seng. NAD ini juga penting sebagai katalis untuk pembentukan serotonin dan senyawa lain yang menunjang kerja saraf. Jika jumlah alkohol dan asetaldehida yang harus dinetralkan terlalu besar dan bersifat kronis, maka siklus pembentukan *Niacin* menjadi terhambat dan dapat menimbulkan penyakit pellagra dan gejala-gejala psikologis (Clearly, 1986)

Dari uraian tersebut dapat disimpulkan bahwa walaupun memiliki aspek ekonomi dan komersial yang tinggi, asetaldehida juga cukup berbahaya bagi kesehatan.

2.2 Tinjauan mengenai Sirup Fruktosa

Sirup fruktosa merupakan cairan kental yang berasal dari hidrolisis pati menjadi glukosa dan selanjutnya diisomerisasi dengan bantuan enzim glukosa isomerase. Sirup ini terutama terdiri dari fruktosa, glukosa, dan sejumlah kecil polisakarida lain.

Fruktosa mulai dikenal sebagai pemanis pengganti sukrosa untuk penderita diabetes pada tahun 1874 namun beberapa masalah yang timbul berkaitan dengan warna, timbulnya rasa pahit (*off flavor*) setelah pemakaian, menyebabkan sirup ini tak pernah dikomersialkan waktu itu.

Proses konversi enzimatis dari glukosa menjadi fruktosa pertama kali dilaporkan pada tahun 1957 dan di patenkan pada tahun 1960. Pada

tahun 1967 dihasilkan sirup dengan kadar fruktosa 15 % dengan proses terputus ("*batch*"), kemudian pada tahun 1968 dihasilkan sirup dengan kadar fruktosa 42 % berat . Pada tahun 1972 mulai dicoba penggunaan proses enzim amobil dengan sistem kontinu (Othmer, 1983).

Karena sirup ini kaya akan fruktosa, maka di dunia Internasional dikenal dengan sebutan "*High Fructose Syrup*" (HFS). Produk-produk komersial dewasa ini mengandung 42, 55, dan 90 % berat fruktosa, dan masing-masing dikenal dengan sebutan HFS-42, HFS-55 serta HFS-90.

2.2.1 Sifat-sifat Sirup Fruktosa

Sirup fruktosa ini mempunyai derajat kemurnian yang amat tinggi, bebas dari ion-ion logam dan ion-ion beracun lainnya seperti timah hitam besi, tembaga, sulfat, sianida, dan sebagainya

Tekanan osmosis sirup fruktosa adalah dua kali tekanan osmosis sukrosa pada konsentrasi yang sama, sehingga perkembangbiakan bakteri, ragi, dan kapang dapat dibatasi. Menurut "The American Bottlers' Association", standar bakteriologi pada sirup fruktosa ini sama dengan pada gula cair; yaitu untuk bakteri mesophilik maksimum 200/10 g, untuk ragi maksimum 20/10 g, dan untuk kapang maksimum 10/10 g.

Kelarutan sirup ini sebanding dengan kelarutan gula invert, lebih cepat daripada glukosa, dan sedikit lebih baik daripada sukrosa. Hal ini mencegah terjadinya kristalisasi selama proses penyimpanan dan pengangkutan. (Tjokroadikoesoemo, 1986; Othmer 1983).

HFS-42 mempunyai kemanisan yang sama dengan sukrosa, HFS-55 mempunyai kemanisan yang sama dengan medium invert dan 1-5 % lebih manis daripada sukrosa. Sedangkan HFS-90 mempunyai kemanisan 15 % lebih manis daripada sukrosa.

2.2.2 Pembuatan Sirup Fruktosa

Sirup dengan kadar fruktosa 42 % (HFS-42) diproduksi secara komersial dengan proses isomerisasi kontinu dari hidrolisat glukosa yang sudah dibersihkan dan dimurnikan dengan bantuan enzim glukosa isomerase. Sedangkan sirup dengan kadar fruktosa 90 % (HFS-90) diperoleh sebagai hasil pemisahan secara kromatografi. Sirup ini kemudian dicampur dengan sirup yang mengandung fruktosa 42 % (HFS-42), dan menghasilkan sirup dengan kadar fruktosa 55 % (HFS-55).

Pada awal pengembangan enzim glukosa isomerase ternyata bahwa proses terputus ("*batch*") membutuhkan waktu yang lama sehingga menyebabkan terjadinya warna, rasa pahit ("*off flavor*") dan hasil samping ("*by product*") berupa gula yang tak dapat dimetabolisme seperti "*psicose*" yang terbentuk pada kondisi alkali. Di samping itu biaya cukup tinggi. Karena itu dikembangkan suatu proses kontinu dengan enzim amobil.

Ada dua tipe proses penggunaan enzim amobil yang dikembangkan untuk tujuan komersial, yaitu proses "*whole-cell*" dan proses "*soluble enzim*".

Proses "*whole-cell*" ini memiliki dua macam metode. Pada metode pertama sel mikroba yang mengandung enzim intraselular yang berasal dari proses fermentasi disentrifuge kemudian dipecah oleh glutaraldehida, diencerkan, digumpalkan oleh penggumpal kation, dan hasil akhirnya diekstraksi, dikeringkan, dan diayak. Pada metode ke dua, sel mikroba tersebut dimasukkan dalam gelatin kemudian direaksikan dengan glutaraldehida yang dilanjutkan dengan pencucian dan pengelompokan partikel berdasarkan ukuran dan pengeringan.

Pada proses "*soluble enzim*", enzim dipisahkan dari sel dan dimurnikan untuk tujuan di-amobil-kan. Karena enzim glukosa isomerase adalah enzim intraselular, dinding sel tersebut mula-mula dirusak secara fisika dengan cara sonifikasi, homogenasi, dan enzyatis. Enzim glukosa isomerase yang sudah larut kemudian dipisahkan secara sentrifuge atau filtrasi dan dipekatkan dengan cara ultrafiltrasi, selanjutnya diamobilkan dengan dua macam metode. Pada metode yang pertama, pengikatan dilakukan dengan cara mencampur larutan enzim tersebut dengan partikel yang mengandung kombinasi dari selulosa, Titanium Oksida, dan Polistirena. Pada metode yang kedua enzim tersebut diikat dengan resin penukar anion, selulosa penukar anion, keramik berpori, dan alumina berpori.

Enzim glukosa isomerase dapat diisolasi dari berbagai mikroba, namun untuk tujuan komersial hanya beberapa mikroba yang digunakan, seperti *Streptomyces olivochromogenes*, *Streptomyces murinus*, *Streptomyces rubiginosus*, *Bacillus coagulans*, *Actinoplanes*

missouriensis, dan *Microbacterium arborescens*. Sifat-sifat enzim tersebut bervariasi tergantung sumbernya, namun semua memiliki kesamaan dalam hal operasionalisasi, pH, dan suhu.

Hidrolisat glukosa yang sudah dibersihkan direaksikan dengan karbon, penukar ion, dan dievaporasi untuk menghasilkan 40 – 50 % berat kering. Mg ditambahkan sebagai ko-faktor untuk mempertahankan kestabilan proses isomerisasi dan mencegah terjadinya penghambatan proses oleh sejumlah kecil Ca. Jika kadar Ca lebih kecil daripada 1 ppm, kadar Mg sebagai $MgSO_4$ sudah cukup. Makin besar kadar Ca, makin banyak Mg yang dibutuhkan. Hidrolisat itu kemudian dilewatkan suatu "fixed bed" berisi enzim glukosa isomerase yang sudah diamobilkan pada kecepatan alir tertentu. Kondisi proses tergantung pada sistem enzim yang digunakan, tapi umumnya dilakukan pada suhu 55 - 65 °C, pH 7,5 – 8,5 , dan waktu awal reaksi sekitar 1 jam untuk menghasilkan sirup dengan kadar fruktosa maksimum 50 – 55 % berat kering.

Hidrolisat yang sudah disomerisasi dan mengandung fruktosa sekitar 42 % berat itu kemudian diasamkan sampai pH 4-5, direaksikan dengan karbon untuk menghilangkan warna, penukar ion untuk menghilangkan garam-garam, dan dipekatkan dengan cara evaporasi sampai diperoleh padatan sekitar 71 %. Karena kandungan fruktosa dalam sirup tersebut sekitar 50 –55 % berat, penyimpanan harus dilakukan pada suhu sekitar 30 –32 °C untuk mencegah terjadinya pengkristalan. Jika terjadi pengkristalan, sirup tersebut dipanaskan sampai 38 °C.

Untuk memperoleh sirup dengan kadar fruktosa lebih tinggi, sirup fruktosa 42 % (HFS-42) itu dialirkan pada kolom absorban yang mengandung Ca atau kation-kation lain. Fruktosa akan tertahan lebih lama dalam kolom dibandingkan dengan glukosa dan polisakarida lain. Jadi eluen yang tidak mengandung fruktosa itu ditampung lebih dahulu sebagai rafinat dan dialirkan kembali ke dalam kolom isomerisasi. Sedangkan hasil ekstraksi yang kaya fruktosa tersebut (HFS-90) dicampur dengan HFS-42 untuk menghasilkan sirup dengan kadar fruktosa 55 % (HFS-55) (Tjokroadikoesoemo, 1986; Othmer, 1983)

2.2.3 Kegunaan

Sirup fruktosa digunakan sebagai pengganti sukrosa atau gula invert pada makanan. Banyak digunakan dalam pembuatan minuman-minuman ringan bersoda (*soft drinks*), pembuatan/pemanggangan roti, pembuatan buah-buahan dalam kaleng serta dalam pembuatan produk-produk dari susu. Pada umumnya digunakan bersama-sama dengan sukrosa. Penggunaan utama sirup ini adalah dalam minuman ringan bersoda, terutama paling banyak digunakan oleh Coca Cola.

Sirup ini juga banyak digunakan sebagai pemanis dalam makanan atau minuman untuk diet karena derajat kemanisannya yang sangat tinggi. Sirup fruktosa dengan kadar 90 % (HFS-90) banyak digunakan pada makanan-makanan sehat dan obat-obatan, juga sebagai gula meja dalam bentuk gula cair, dan digunakan pada produk-produk rasa madu, dan sebagainya. (Tjokroadikoesoemo, 1986; Othmer, 1983)

2.3 Tinjauan mengenai Proses Fermentasi

2.3.1 Tinjauan umum

Menurut Zapzalis dan Beck (1986) fermentasi merupakan proses peruraian senyawa organik oleh enzim dengan adanya udara untuk menghasilkan senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Proses tersebut berhubungan dengan pertumbuhan dan metabolisme dari mikroorganisme pada karbohidrat dan turunannya pada media organik, yang dipengaruhi oleh kondisi lingkungan.

Hampir semua karbohidrat dan turunannya dapat difermentasi oleh paling sedikit satu jenis ragi, kapang, atau bakteri. Substrat umumnya berupa tepung, selulosa, polisakarida "chitin", disakarida, monosakarida, gula-gula asam, serta alkohol polihidrat. Walaupun setiap jenis mikroorganisme (mikroba) adalah khas untuk jenis substrat tertentu, glukosa dengan mudah dapat difermentasikan oleh hampir semua mikroba dengan mengikuti jalur "*Embden-Meyerhof-Parnas*" (EMP)

2.3.2 Fermentasi Alkoholik dan Asam Laktat

Beberapa mikroba hanya dapat menghasilkan satu hasil samping fermentasi (*by product*) dan disebut sebagai "*homofermentative*". Sedangkan mikroba yang dapat menghasilkan campuran produk-produk fermentasi yang lebih kompleks dikenal sebagai "*heterofermentative*". Sebagai contoh, bakteri yang menghasilkan asam laktat saja disebut sebagai "homolaktat" sedangkan yang dapat menghasilkan asam laktat,

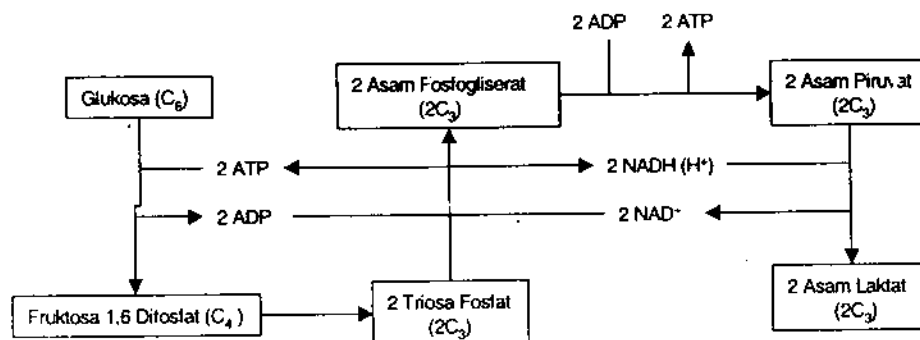
aldehida-aldehida, keton-keton, dan alkohol-alkohol lain dari asam piruvat disebut sebagai "heterolaktat".

Jika proses fermentasi untuk menghasilkan asam laktat dilakukan oleh bakteri, maka proses fermentasi untuk menghasilkan etanol dilakukan oleh ragi, dan disebut sebagai "homoetanolat".

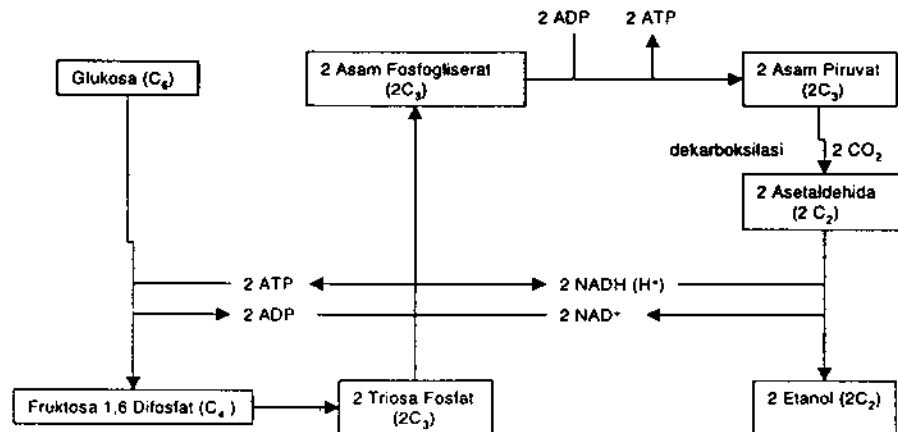
Proses fermentasi "homoetanolat" ini sebagaimana halnya fermentasi "homolaktat", mengikuti jalur *Embden-Meyerhof-Parnas* (EMP). Pada tahap awal proses, jalurnya identik. Dua molekul Adenosin Tri Phosphat (ATP) diperlukan untuk menghasilkan fruktosa 1,6- difosfat. Namun pada proses homoetanolat, asam piruvat yang dihasilkan mengalami dekarboksilasi sehingga menghasilkan asetaldehida yang selanjutnya mengalami reduksi menjadi etanol.

Uraian di atas dapat diperjelas dengan skema berikut :

Skema proses fermentasi homolaktat

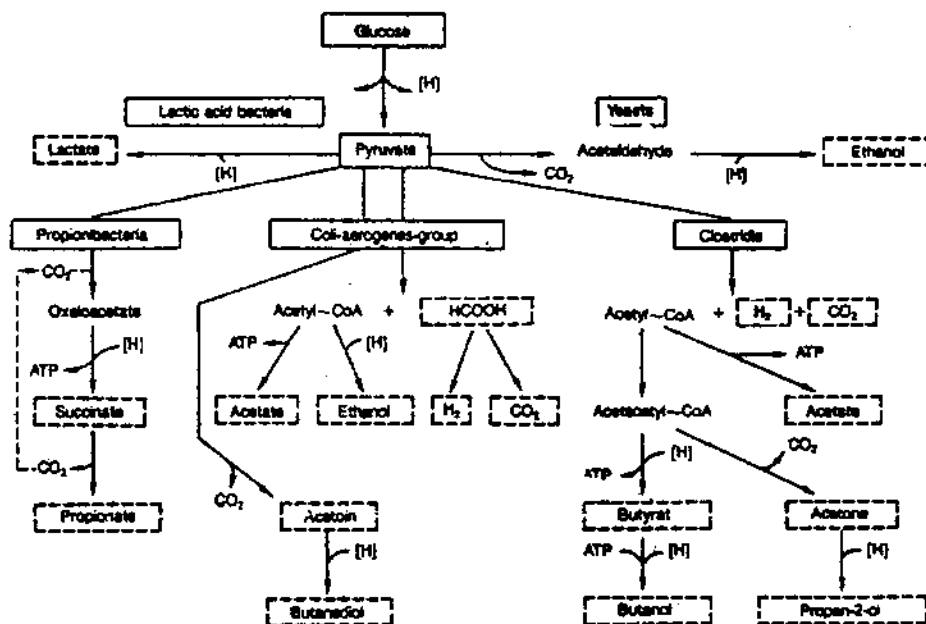


Skema proses fermentasi homo etanolat



Gambar 2.1 Skema proses fermentasi homolaktat dan homoetanolat (Zapzalis dan Beck, 1986)

Skema secara lengkap digambarkan oleh Prave, et al (1987)



Gambar 2.2 Skema proses fermentasi (umum)
(Dikutip dari "*Basic Biotechnology-A Student Guide*" by Prave, et al.,1987: 95)

Asam piruvat didekarboksilasi menjadi asetaldehida dengan bantuan ragi ("yeast") yang selanjutnya direduksi menjadi etanol.

2.4 Tinjauan tentang Kromatografi Gas

Dasar pemisahan secara kromatografi gas adalah penyebaran cuplikan (analit) di antara dua fase, yaitu fase diam dan fase mobil yang berupa gas (McNair dan Bonelli, 1988). Kromatografi gas ini dapat digunakan untuk memisahkan dan menganalisis secara langsung sampel-sampel berupa gas, cairan atau larutan, dan sampel padat yang mudah menguap ("*volatile*"). Teknik ini digunakan secara luas dalam berbagai bidang, misalnya dalam bidang-bidang farmasi dan obat-obatan, studi lingkungan, industri petroleum, kimia klinik, analisis pestisida dan residunya, serta dalam bidang makanan dan minuman (Grob, 1985).

Teknik kromatografi gas ini memiliki beberapa keunggulan dibandingkan teknik pemisahan yang lain. Beberapa keunggulan itu di antaranya : dapat untuk memisahkan campuran yang memiliki titik didih yang berdekatan, yang tak dapat dipisahkan dengan cara distilasi, dapat untuk mendeteksi analit sampai ukuran bagian per juta, bagian per bilyun, dengan ukuran sampel 1 μl atau lebih kecil, waktu analisis yang relatif singkat, detektornya relatif sederhana, mempunyai kepekaan yang tinggi, dan respon yang cepat, data yang diperoleh dari detektor dapat direkam dengan mudah, dan dapat digunakan untuk memantau secara otomatis proses kimia yang terjadi (Mc Nair dan Bonelli, 1988; Grob, 1995)

Kromatografi gas dapat digunakan untuk analisis secara kualitatif berdasarkan data waktu retensi atau waktu retensi (t_r)

(*retention time* atau RT) serta analisis secara kuantitatif berdasarkan data ukuran puncak / luas areanya (Debbrecht, 1985).

Dengan membandingkan data waktu retensi analit dalam sampel dengan waktu retensi senyawa standar dapat diketahui apakah sampel tersebut mengandung senyawa yang ingin diteliti atau tidak. Sedangkan pengukuran secara kuantitatif dilakukan dengan membandingkan luas area analit dalam sampel dengan luas area larutan standar, berdasarkan kurva kalibrasi yang telah ditentukan.

Bagian-bagian terpenting dari suatu alat kromatograf gas meliputi gas pembawa (*carrier gas*) sebagai fase mobil, sistem inlet/gerbang suntik (*injection port*), kolom (*oven*), alat pendeteksi/detektor (*detector*), dan alat perekam (*recorder*), serta termostat untuk mengatur suhu pada gerbang suntik, kolom, serta detektor (Mc Nair dan Bonelli, 1988).

2.4.1 Gas Pembawa

Gas pembawa harus bersifat lembam (*inert*) untuk mencegah antar aksi dengan analit atau fase diam dalam kolom dan mempunyai derajat kemurnian yang tinggi ("*ultra high purity*" = UHP). Umumnya digunakan gas hidrogen, helium, atau nitrogen, tergantung jenis detektor yang digunakan. Pada suhu tertentu, laju aliran gas yang tetap akan mengelusi komponen campuran pada waktu tertentu, yang disebut sebagai waktu retensi (Mc Nair dan Bonelli, 1988). Gas pembawa yang digunakan dalam penelitian ini adalah gas nitrogen (N_2) dengan kualitas kemurnian yang sangat tinggi ("*Ultra High Purity*")



2.4.2 Gerbang suntik/Sistem Inlet

Gerbang suntik merupakan tempat untuk memasukkan cuplikan berisi analit yang akan diteliti. Cuplikan harus disuntikkan sekaligus dengan cepat. Suhu pada gerbang suntik ini harus cukup tinggi untuk menguapkan cuplikan dengan cepat, namun juga cukup rendah untuk mencegah penguraian atau penataan ulang akibat panas. Cara mengujinya adalah dengan menaikkan suhunya, jika kolom menjadi lebih efisien dan bentuk puncak lebih baik, berarti suhunya terlalu rendah. Namun jika waktu retensi, luas puncak, atau bentuk puncak berubah drastis, berarti suhu mungkin terlalu tinggi sehingga terjadi penguraian atau penataan ulang (Mc Nair dan Bonelli, 1988)

2.4.3 Kolom

Pemisahan komponen-komponen dalam cuplikan sebenarnya terjadi di dalam kolom, karena itu kolom merupakan jantung dari suatu kromatograf gas. Suhu kolom harus cukup tinggi sehingga waktu analisis tidak terlalu lama, namun harus cukup rendah sehingga pemisahan yang dikehendaki dapat tercapai. Jika cuplikan terdiri dari komponen yang memiliki rentang titik didih yang lebar, sebaiknya digunakan suhu yang diprogram ("*programmed temperature*") (Mc Nair dan Bonelli, 1988).

Dua tipe kolom yang biasa digunakan adalah kolom kemas (*packed column*) dan kolom kapiler (*capillary column*). Kolom kemas terdiri dari bahan padat yang bersifat lembam (*inert*) yang menyangga lapisan

tipis cairan tak atsiri di dalam tabung dari kaca atau logam. Keuntungan kolom ini, mudah dibersihkan dan diisi kembali jika efisiensinya berkurang. Sedangkan kolom kapiler berupa tabung terbuka bergaris tengah sangat kecil dan fase diamnya berupa lapisan tipis cairan yang melapisi dinding tabung bagian dalam. Kolom ini lebih panjang daripada kolom kemas, sehingga meningkatkan resolusi atau daya pisah. Pemilihan jenis fase diam yang berupa cairan ini bergantung pada susunan cuplikan (analit) dan kepolarannya (James, 1995; Mc Nair dan Bonelli, 1988).

Dalam penelitian ini digunakan kolom supelcowax yang berisi carbowax (poliolietilen glikol) yang bersifat polar. Adanya gugus hidroksil menyebabkan senyawa-senyawa yang sama-sama mengandung gugus "hidroksil" seperti metanol dan etanol tertahan lebih lama di dalam kolom

2.4.4 Detektor

Detektor menunjukkan adanya komponen analit dalam suatu cuplikan dan mengukur kuantitasnya. Detektor yang baik adalah yang memiliki kepekaan tinggi, tingkat derau (*noise*) nya rendah, dan rentang liniernya lebar

Ada dua jenis detektor, yaitu detektor integrasi yang memberi tanggapan terhadap konsentrasi, misalnya detektor hantar bahang (DHB) atau *Thermal Conductivity Detector* (TCD), dan detektor diferensiasi yang memberi tanggapan terhadap laju aliran massa, misalnya detektor pengionan nyala (DPN) atau *Flame Ionization Detector* (FID). Detektor deferensiasi ini lebih sering digunakan karena kesesuaian dan

ketelitiannya cukup tinggi, di mana luas puncak yang dihasilkan berbanding lurus dengan massa keseluruhan komponen tersebut (James, 1995; Mc Nair dan Bonelli, 1988)

Suhu pada detektor dan sambungan antara kolom dan detektor harus cukup tinggi untuk mencegah pengembunan yang akan mengakibatkan terjadinya pelebaran puncak dan menghilangnya puncak komponen. Untuk detektor pengionan nyala suhu harus cukup tinggi untuk mencegah pengembunan air atau hasil samping yang terbentuk pada proses pengionan (Mc Nair dan Bonelli, 1988)

2.4.5 Perekam dan Pengolah Data / Integrator

Data kromatogram yang diperoleh dari detektor dimasukkan ke dalam alat perekam dan pengolah data yang mengubah sinyal yang masuk menjadi ukuran luas puncak.

Keunggulan suatu integrator elektronik adalah rentang liniernya yang lebar, mulai 0 – 1400 mV, sehingga tak perlu terlalu sering mengubah pelayan / atenuasi (*attenuation*) (Mc Nair dan Bonelli, 1988)

2.5 Tinjauan tentang Validasi Metode Analitik

Validasi metode adalah suatu proses pembuktian bahwa suatu metode atau prosedur analitik dapat diterima sesuai dengan tujuan penelitian. Hasil validasi dapat menjadi tolok ukur perlu atau tidak dilakukan perubahan dalam suatu metode atau prosedur. Jika dilakukan

perubahan, maka setelah perubahan perlu dilakukan validasi ulang (Green, 1996)

Paramater-parameter validasi tersebut di antaranya adalah selektivitas (*specificity*), linieritas (*linearity*), akurasi (*accuracy*), presisi (*precision*), batas deteksi (*detection batas*), dan batas kuantitasi (*quantitation batas*) (Green, 1996). Ke enam macam uji validasi tersebut oleh Indrajanto (1995) dikelompokkan menjadi uji validasi awal

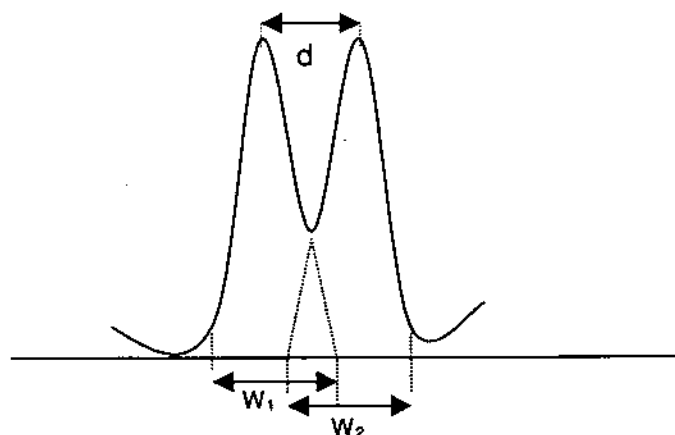
Penentuan parameter yang perlu diuji tersebut tergantung pada tujuan analisis (Green, 1996).

United States Pharmacopeia (USP) XXII (1990) mengkategorikan tujuan analisis tersebut ke dalam tiga kategori : Kategori I, menentukan komponen utama dalam obat atau komponen-komponen penyusun lain dalam suatu produk farmasi yang sudah jadi, kategori II, menentukan pengotor (*impurities*) dalam obat atau dalam suatu produk farmasi yang sudah jadi, dan kategori III, menentukan karakteristik dari suatu produk farmasi yang sudah jadi, seperti profil disolusi dan keseragaman isinya. Kategori I, II, dan III tersebut menurut WHO diklasifikasikan sebagai kelas B, C, dan D, secara berurutan. Sedangkan kelas A menurut WHO (1992) adalah menentukan identitas komponen-komponen utama atau komponen-komponen lain dalam suatu produk farmasi yang sudah jadi.

2.5.1 Selektivitas

Selektivitas suatu metode adalah kemampuan suatu metode untuk memastikan bahwa puncak yang dihasilkan oleh analit tersebut benar-

benar murni, tidak tercemar oleh zat-zat lain (*impurities*). Hal ini dilakukan dengan cara membandingkan waktu retensi analit dalam campuran yang mengandung analit dan semua komponen yang mungkin berada dalam sampel, dengan waktu retensi analit dalam larutan yang hanya mengandung analit tersebut. Puncak analit tersebut kemudian dianalisis dan dihitung resolusinya dengan puncak yang berdekatan. (Green, 1996; Indrajanto, 1995)



Resolusi (R) dapat dihitung dengan rumus

$$R = 2d / (w_1 + w_2)$$

2.5.2 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi merupakan konsentrasi terkecil dari analit dalam sampel yang dapat dibedakan dari blanko namun tidak harus dihitung. Satuannya adalah sama dengan satuan konsentrasi analit dalam sampel

Sedangkan batas kuantitasi merupakan nilai konsentrasi analit terkecil dalam sampel yang dapat ditentukan presisi dan akurasinya pada kondisi tertentu (Indrajanto, 1995; USP XXIII, 1995)

Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi ini dapat dilakukan dengan beberapa cara. Menurut Carl dan Warlich (1990) penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi ditentukan dengan menggunakan rumus :

$$C_1 (Q_1) = k \times S_B / S_i$$

di mana k adalah konstanta yang besarnya 3 untuk penentuan batas deteksi dan 10 untuk penentuan batas kuantitasi, S_B adalah standar deviasi dari signal blanko, sedangkan S_i adalah sensitivitas "*slope*" yang menyatakan hubungan antara respon detektor (y) terhadap konsentrasi (x). Harga S_B ini ditentukan dengan rumus

$S_B = N_{p-p} / 5$ di mana N_{p-p} adalah "*noise*" yang merupakan jarak antara puncak tertinggi dan puncak terendah yang diukur pada daerah 20 kali lebar puncak analit atau 20 kali lebar puncak pada 1/2 tinggi puncak analit pada penyuntikan blanko. Harga N_{p-p} ini dapat pula ditentukan berdasarkan standar deviasi terbesar dari harga rata-rata, di mana harga S_B adalah $N_p / 2$. Karena "*noise*" ditentukan berdasarkan fluktuasi tinggi puncak, sedangkan metode yang divalidasi adalah berdasarkan pengukuran luas area, maka perlu dibuktikan dengan menganalisis sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu

Penentuan batas deteksi ini dapat pula dilakukan dengan membandingkan signal analit terhadap "*noise*" dengan cara membandingkan hasil penyuntikan analit dengan konsentrasi yang telah diketahui dan hasil penyuntikan blanko dan menentukan tingkat minimum di mana analit tersebut masih dapat dideteksi. Dalam hal ini, perbandingan signal : "*noise*" sebesar 2 : 1 atau 3 : 1 umumnya dapat diterima. Cara lain

adalah dengan menganalisis sejumlah blanko dan menghitung standar deviasi dari respon detektor, kemudian mengalikannya dengan suatu faktor, umumnya 2 atau 3 sebagai perkiraan batas deteksinya (atau 10 untuk perkiraan batas kuantitasnya), kemudian menganalisis sejumlah analit dengan konsentrasi yang mendekati harga batas deteksi tersebut untuk verifikasi (United State Pharmacopeia XXIII, 1995).

2.5.3 Linieritas dan Rentang

Linieritas suatu metode analitik adalah kemampuan metode tersebut untuk membuktikan bahwa larutan sampel berada dalam rentang konsentrasi di mana respon analit berbanding secara linier terhadap konsentrasi. Hal ini dilakukan dengan cara menyiapkan larutan standar pada beberapa tingkat konsentrasi yang diperkirakan berada dalam sampel (target), kemudian dianalisis dan dibuat kurva kalibrasinya berdasarkan persamaan regresi $y = a + b x$

Rentang (range) merupakan jarak/interval antara nilai tertinggi dan nilai terendah yang dapat ditentukan presisi, akurasi, dan linieritasnya (USP XXIII, 1995)

2.5.3.1 Akurasi

Akurasi suatu metode adalah kedekatan nilai hasil pengukuran dengan nilai sesungguhnya dalam sampel.

Menurut Green (1996) akurasi ini dapat ditentukan melalui empat cara. Pertama dengan menganalisis sampel yang konsentrasi standarnya

diketahui dan membandingkan nilai hasil pengukuran dengan nilai sebenarnya. Cara kedua adalah membandingkan hasil uji metode baru dengan hasil uji metode yang sudah ada yang sudah pasti keakuratannya. Cara ketiga dan keempat berkaitan dengan rekoveri. Cara ketiga adalah menambahkan analit ke dalam blanko dan memperlakukannya sama seperti perlakuan terhadap sampel. Sedangkan cara keempat dengan menggunakan metode standar adisi. Perhitungan persen rekoveri dilakukan dengan rumus :

$$\% \text{ Rekoveri} = \frac{\text{konsentrasi analit yang ditemukan} \times 100\%}{\text{konsentrasi analit sebenarnya}}$$

Harga persen rekoveri ini selanjutnya dianalisis dengan uji-t untuk mengetahui apakah akurasi cukup baik atau tidak

2.5.4 Presisi

Presisi suatu metode merupakan tingkat kesesuaian hasil-hasil yang diperoleh (WHO, 1992). Umumnya diekspresikan sebagai standar deviasi (SD) atau koefisien variasi fungsi (KV) atau standar deviasi relatif (*relative standard deviation* atau RSD)

Harga KV ini menurut Edwardson et al (1990) sebaiknya lebih kecil atau sama dengan 2, sedangkan untuk analisis runut (Soemadi, 1994) atau penetapan kadar obata dalam cairan tubuh untuk tujuan klinis (Buick, et al, 1990), harga presisi dan akurasi cukup memadai jika lebih kecil atau sama dengan 10%.

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL

Sirup fruktosa merupakan salah satu produk makanan yang banyak digunakan sebagai pengganti gula (sukrosa), yang berasal dari hidrolisis pati yang kemudian diisomerisasi. Karena wujudnya yang berupa cairan kental, sirup tersebut merupakan media bagi perkembangan mikroba yang mungkin masih berada di dalamnya, apalagi jika wadah penyimpanannya kurang bersih. Dengan demikian kemungkinan di dalam sirup tersebut terjadi proses fermentasi yang dapat menghasilkan asetaldehida sebagai hasil antara (*"by product"*) yang tidak diharapkan.

Keberadaan asetaldehida dalam sirup tersebut dapat menimbulkan perubahan terhadap bau dan rasa produk-produk makanan/minuman yang menggunakan sirup tersebut sebagai pemanis (Curtis, 1998). Selain itu asetaldehida dalam tubuh bereaksi dengan hemoglobin (Hb) dalam darah sehingga mengakibatkan sirkulasi oksigen ke otak berkurang (Tsuboi, et al, 1981). Senyawa ini juga memiliki kecenderungan bereaksi dengan vitamin B1 (*Thiamin*) (Dreyfus dan Victor, 1971) dan dengan "*Nicotinamide Adenosin Diphosphat*" (NAD), suatu bentuk ko-enzym dari vitamin B3 (*Niacin*) (Clearly, 1986) sehingga menimbulkan defisiensi vitamin tersebut.

Berdasarkan alasan-alasan tersebut di atas, keberadaan asetaldehida dalam sirup fruktosa tersebut perlu ditentukan kadarnya. Karena asetaldehida yang terjadi dalam sirup tersebut merupakan hasil fermentasi, maka diperkirakan berada dalam jumlah runtu. Senyawa ini

juga bersifat "*volatile*", sehingga penetapan kadarnya umumnya dilakukan dengan cara kromatografi gas. Untuk itu perlu dilakukan pemisahan dan pemurnian sebelum disuntikkan ke dalam kolom kromatograf gas. Sebagai produk fermentasi, asetaldehida dapat dilepaskan dari sirup dengan cara pemanasan, namun harus segera didinginkan kembali supaya tidak lenyap di udara. Salah satu metode preparasi yang sesuai dengan kondisi tersebut adalah metode distilasi.

Distilasi dilakukan terhadap standar maupun sampel, yang masing-masing diencerkan dulu dengan air dan dengan asam dengan perbandingan 1 : 1 sebelum didistilasi. Distilat yang diperoleh kemudian dianalisis dengan cara kromatografi gas.

Penelitian ini menggunakan kolom kapiler sebagai kolom kromatografi gas, yang berisi senyawa carbowax (polietilen glikol) yang bersifat polar, karena asetaldehida juga bersifat polar. Sedangkan detektor yang digunakan adalah detektor pengionan nyala (DPN) atau "*Flame Ionization Detector*" (FID) yang memiliki rentang linier paling tinggi. Detektor ini juga sesuai untuk menganalisis asetaldehida yang bersifat "*volatile*".

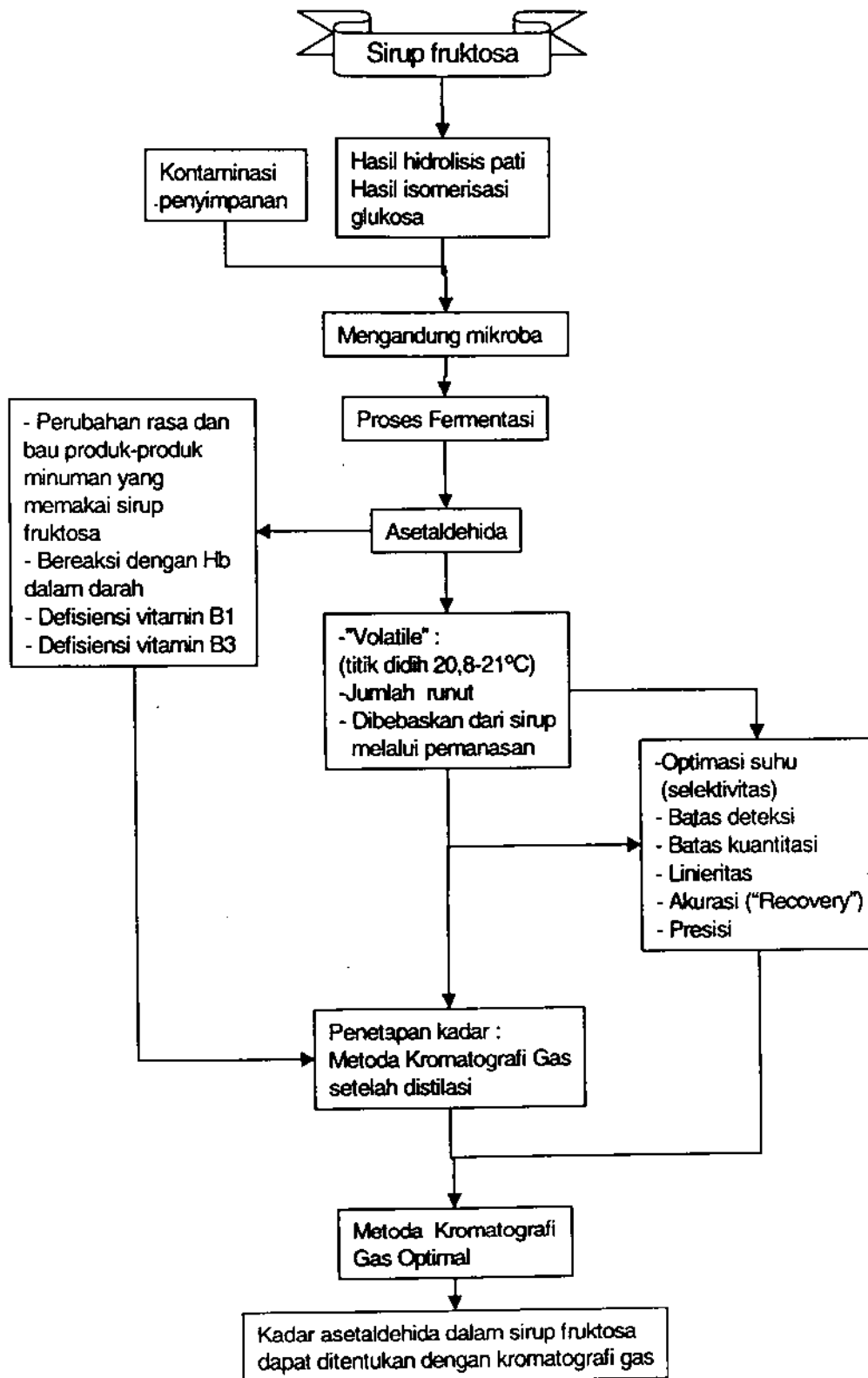
Karena asetaldehida ini merupakan hasil antara dalam proses glikolisis dari asam piruvat menjadi etanol, sedangkan etanol umumnya mengandung metanol, perlu dilakukan pengujian terhadap waktu retensi ketiga macam senyawa tersebut. Berdasarkan titik didih dan sifat kepolaran (hidrofil) nya, etanol akan tertahan lebih lama dalam kolom dibandingkan dengan metanol. Dengan demikian penentuan selektivitas

dan perhitungan resolusi untuk optimasi suhu kolom dilakukan dengan membandingkan waktu retensi asetaldehida standar dengan waktu retensi metanol standar. Setelah penentuan selektivitas dan optimasi suhu selesai dilakukan, maka dilakukan uji validasi selanjutnya, yaitu penentuan batas deteksi, batas kuantitasi, linieritas, akurasi, serta presisi terhadap asetaldehida standar.

Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi dilakukan dengan cara penyuntikan pelarut blanko dan mengukur fluktuasi "*noise*" yang dihasilkan. Penentuan linieritas dilakukan terhadap larutan asetaldehida standar berbagai konsentrasi untuk menentukan kurva baku / kalibrasi luas area terhadap konsentrasi yang akan digunakan dalam penetapan kadar asetaldehida. Penentuan akurasi dilakukan terhadap larutan asetaldehida standar dengan konsentrasi yang diketahui, yang diperlakukan sama seperti perlakuan terhadap sampel, yaitu didistilasi dengan air dan dengan asam, masing-masing dengan perbandingan 1 : 1. Distilat yang diperoleh kemudian dianalisis, dihitung konsentrasinya, dan hasilnya dibandingkan dengan konsentrasi mula-mula sebelum distilasi. Penentuan presisi dilakukan dengan cara penyuntikan standar maupun distilat berulang-ulang sehingga diperoleh tiga harga yang memiliki koefisien variasi di bawah 10 %.

Setelah uji validasi selesai dilakukan maka dilakukan analisis terhadap distilat sampel hasil distilasi dengan air (grup A) dan hasil distilasi dengan asam (grup B), serta dilakukan perhitungan terhadap kadar asetaldehida yang berada dalam sampel tersebut

Skema kerangka konseptual



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan-bahan Penelitian

4.1.1. Sirup fruktosa.

Sirup ini diperoleh dari toko bahan kimia "Multi Aroma" di Pasar Kembang Surabaya, dijual dalam kantong-kantong plastik dalam ukuran 1 kg dan tidak tercantum label produsen maupun nomor Batch-nya.

4.1.2 Larutan standar asetaldehida dari Merck

Larutan ini memiliki derajat kemurnian 99,9 %

4.1.3 Larutan asam fosfat "*pro-analysis*" (p.a) 85 %

4.1.4 Asam sitrat anhidrida "*pro analysis*" (p.a)

4.1.5 Gas Nitrogen (N₂) dengan kualitas "*Ultra High Purity*" (UHP)

4.1.6 Aquabidest

4.2 Peralatan Penelitian

4.2.1 Peralatan distilasi

Peralatan distilasi yang digunakan adalah peralatan distilasi sederhana berupa labu dasar bulat berleher tiga (satu "leher" ujungnya buntu dan digunakan untuk tempat termometer untuk mengukur suhu larutan), yang dihubungkan dengan kolom "*Vigreux*" dengan panjang sekitar 30 cm dan ujung bagian atas dilengkapi dengan termometer untuk mengukur suhu pada bagian atas kolom. Labu ini dicelupkan ke dalam

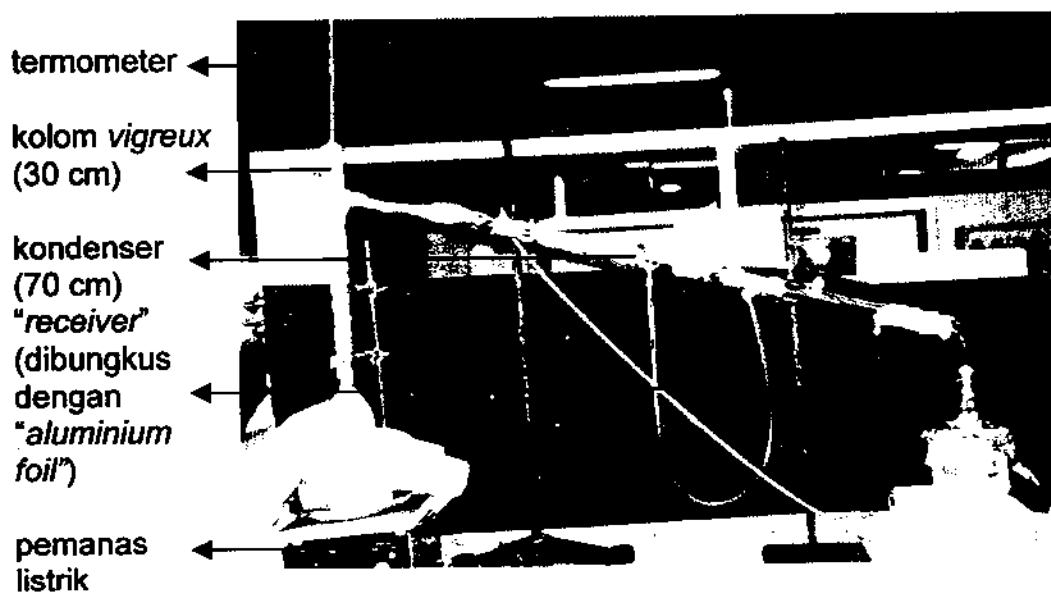
penangas air yang berisi air dingin sedemikian sehingga suhu larutan nantinya sekitar 18-20 °C (sebelum dipanaskan).

Kolom "*vigreux*" ini dirangkai dengan dua kondenser (pendingin) yang masing-masing mempunyai diameter 29/32 dengan panjang keseluruhan sekitar 70 cm. Ujung kondenser dihubungkan dengan "*adapter*" sepanjang 25 cm dan dirangkai sedemikian sehingga ujungnya dapat tercelup ke dalam larutan dalam wadah penampung ("*receiver*"). "*Receiver*" ini dicelupkan ke dalam potongan-potongan es batu dan bagian luarnya dibungkus dengan aluminium foil untuk menjaga suhu tetap dingin. Demikian pula seluruh bagian luar kolom "*vigreux*" dan "kondenser".

Kondenser dialiri air dingin dengan menggunakan "*Cooling Unit*" merk "TAIVO" 400 A dan "*Hand Pump*" merk "HITACHI" Tipe C-P30F. Sedangkan untuk pemanas digunakan pemanas listrik merk "FISHER"

Susunan rangkaian peralatan distilasi dapat dilihat pada gambar

4.1



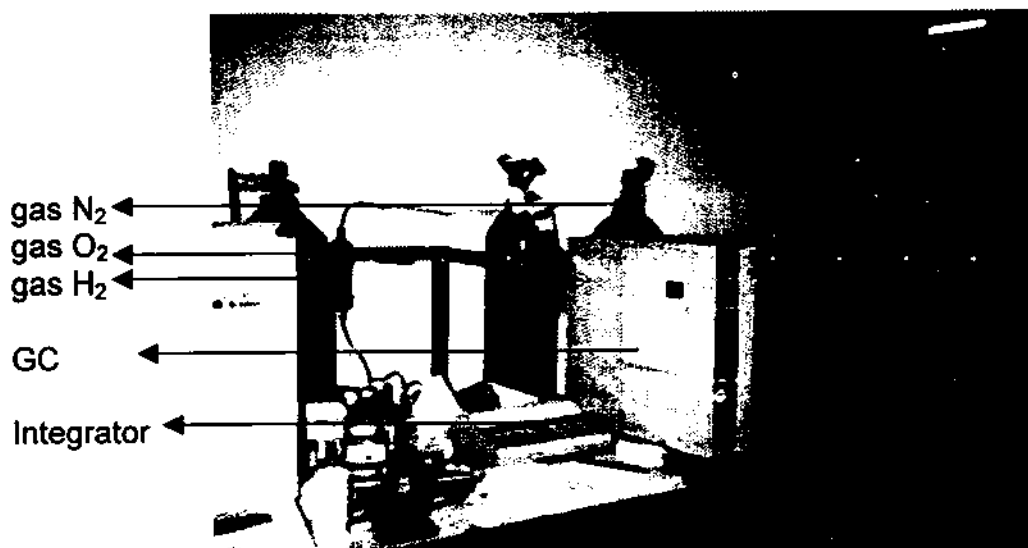
Gambar 4.1 Rangkaian peralatan distilasi penelitian

4.2.2 Peralatan kromatograf gas

Kromatograf gas yang digunakan dalam penelitian ini adalah produksi dari *Hewlett Packard HP 5890 series II* dengan kolom "*Fused Silica Supelcowax*" 10, sepanjang 30 m, dengan diameter dalam 0,25 mm. Detektor yang digunakan adalah detektor pengionan nyala (DPN) atau yang umumnya dikenal dengan nama "*Flame Ionization Detector*" (FID). Gas pembawa ("*carrier*") yang digunakan adalah gas nitrogen (N_2) dengan kualitas kemurnian yang sangat tinggi ("*Ultra High Purity*" = UHP). Sebagai pembakar digunakan gas hidrogen (H_2) dan oksigen (O_2), masing-masing dengan kualitas UHP juga. Untuk alat suntiknya digunakan siring mikro merk "HAMILTON" dengan volume 10 μ l. Integrator Hewlett Packard 3392 A

Peralatan kromatograf gas (GC) tersebut dapat dilihat pada gambar

4.2



Gambar 4.2 Peralatan Kromatograf Gas HP 5890 series II

4.3 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Dasar Bersama (LDB) lantai 2, Universitas Airlangga Surabaya selama lima belas bulan, mulai September 1999 sampai Januari 2001.

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Persiapan

a. Pembuatan campuran asam ("*mixed acids*")

Ke dalam labu ukur 1 liter yang berisi sekitar 200 ml aquabidest, dimasukkan asam fosfat (H_3PO_4) sebanyak 20,84 gram dan dicampur baik-baik, kemudian ditambahkan sekitar 5,07 gram asam sitrat, dan dicampur sampai larut. Selanjutnya larutan tersebut diencerkan sampai tanda batas sambil dikocok dengan hati-hati, dan dipindahkan ke botol pereaksi yang telah bersih dan sebelumnya dibilas lebih dahulu dengan larutan tersebut.

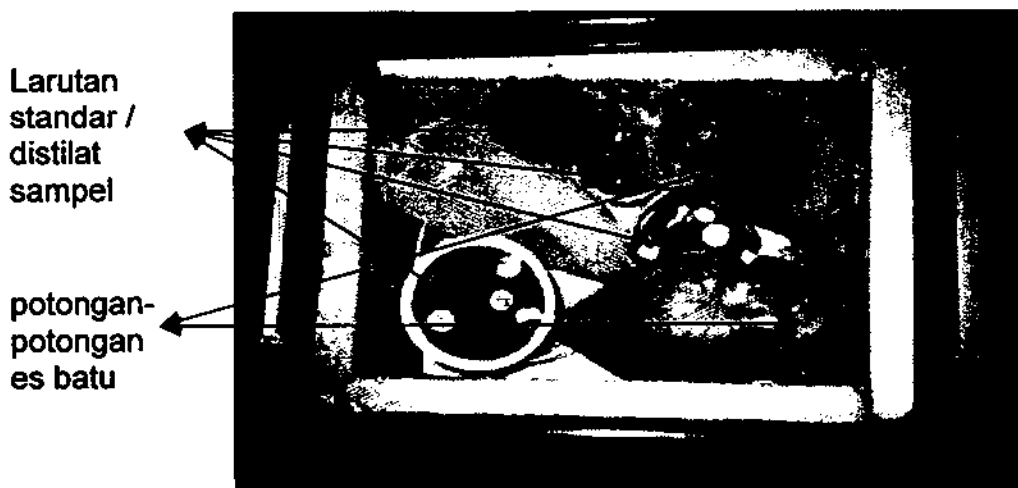
b. Pembuatan air bebas oksigen

Sejumlah aquabidest (sesuai kebutuhan) dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan kaca arloji, kemudian dipanaskan pada suhu rendah sampai semua gelembung yang ada hilang. Selanjutnya air tersebut didinginkan dan dimasukkan ke dalam labu ukur sekitar tiga per empat ($3/4$) bagian dan dialiri gas nitrogen selama kurang lebih satu jam sebelum digunakan untuk mengusir sisa-sisa oksigen yang ada.

c. Pembuatan larutan asetaldehida standar

Untuk pembuatan kurva baku dibuat larutan asetaldehida standar dengan konsentrasi sekitar 3.000 ppm, dan 100 ppm dengan cara penimbangan labu ukur 100 ml yang berisi air bebas oksigen dan ditutup dengan aluminium foil, kemudian asetaldehida dimasukkan dengan pipet pasteur sehingga diperoleh berat asetaldehida sekitar 0,3 gram (300 mg/100 ml) dan 0,01 gram, baru kemudian diencerkan sampai tanda batas. Larutan 3.000 ppm tersebut kemudian diencerkan secara bertahap sehingga diperoleh konsentrasi sekitar 1.000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, dan 5 ppm. Sedangkan larutan standar 100 ppm diencerkan sampai diperoleh konsentrasi sekitar 10 ppm, 5 ppm, 1 ppm, dan 0,5 ppm untuk penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi. Larutan ini diencerkan jika akan dianalisis, dan disimpan dalam kotak yang dilapisi "foam" (gabus) dan diisi dengan potongan-potongan es batu seperti pada gambar 4.3

Untuk penentuan rekoveri dibuat larutan asetaldehida standar dengan konsentrasi sekitar 10.000 ppm, 4.000 ppm, dan 2.000 ppm, masing-masing sebanyak tiga. Larutan standar untuk rekoveri ini kemudian dipipet sebanyak 25 ml dan dimasukkan ke dalam labu ukur 250 ml, lalu diencerkan sampai tanda batas dengan menggunakan air bebas oksigen, dan segera disimpan dalam lemari pendingin sampai digunakan



Gambar 4.3 Kotak "pendingin" tempat larutan yang akan dianalisis dengan kromatograf gas

4.4.2 Distilasi larutan asetaldehida standar

Larutan asetaldehida standar yang dibuat untuk penentuan rekoveri tersebut diambil sebanyak 100 ml dan dimasukkan ke dalam labu distilasi yang sudah dicelupkan ke dalam penangas berisi air dingin, kemudian ditambah aquabidest sebanyak 100 ml. Selanjutnya labu yang sudah dirangkai dengan peralatan distilasi seperti pada gambar 4.1 tersebut dialiri dengan gas nitrogen kualitas UHP untuk mengusir oksigen yang berada di dalamnya, baru kemudian pemanas dipasang pada posisi "LOW" sedangkan "stirer" pada posisi no.5. Antara penangas berisi air dingin dan pemanas diberi lapisan kain untuk menyerap air yang mengembun sehingga tidak merusakkan pemanas listrik tersebut.

Distilat ditampung dalam "receiver" berisi aquabidest 1 ml yang dicelupkan ke dalam potongan-potongan es batu dan dibungkus dengan aluminium foil seperti pada gambar 4.1.

Distilasi diulang dengan larutan standar yang sama, namun sebagai pengganti aquabidest digunakan campuran asam (*"mixed acid"*) yang telah dibuat sebelumnya, juga dengan volume 100 ml.

Untuk setiap konsentrasi dilakukan enam kali distilasi, tiga dengan aquabidest, dan tiga dengan campuran asam (yang kemudian dihitung rata-ratanya), masing-masing selama tiga jam, sehingga diperoleh 18 distilat secara keseluruhan. Selama distilasi diusahakan agar suhu pada bagian atas kolom "*vigreux*" tidak melebihi 30 °C (Adams, et al, 1970)

4.4.3 Distilasi sampel sirup fruktosa

Sampel sirup fruktosa dibagi menjadi dua, grup A dan grup B. Grup A adalah 100 ml sirup yang dicampur dengan 100 ml air (aquabidest), sedangkan grup B adalah 100 ml sirup yang dicampur dengan 100 ml asam. Prosedur distilasi sama seperti terhadap larutan standar.

Sebelum didistilasi, sampel sirup tersebut ditimbang dengan neraca analitik. Untuk setiap grup dilakukan empat kali penimbangan sehingga diperoleh 8 sampel, dengan kode IA, IIA, IIIA, IVA, dan IB, IIB, IIIB, IVB.

4.4.4 Analisis dengan kromatografi gas

Mula-mula dilakukan optimasi terhadap suhu awal kolom yang akan digunakan dalam seluruh analisis. Optimasi ini dilakukan baik terhadap larutan standar maupun terhadap sampel, pada suhu awal 35 °C, 40 °C, 45°C, dan 50°C, dengan cara menghitung resolusi (daya pisah) antara puncak asetaldehida dengan puncak terdekat. Suhu awal ini

dipertahankan selama 4 menit, kemudian naik 40 °C/menit sehingga mencapai suhu akhir 200 °C.

Selektivitas (pengujian kemurnian puncak asetaldehida) dilakukan dengan cara penyuntikan campuran asetaldehida dan metanol standar dengan volume 1 µl pada berbagai variasi suhu awal kolom kromatograf gas, diikuti dengan penyuntikan sampel pada kondisi suhu yang sama. Selanjutnya dilakukan perbandingan waktu tambat/retensi (t_r) setiap senyawa yang diperoleh pada masing-masing suhu kolom.

Untuk memastikan bahwa puncak yang ditemukan dalam distilat sampel adalah benar-benar puncak asetaldehida, maka setelah suhu optimum ditentukan, distilat sampel yang diperoleh tersebut ditambah dengan larutan asetaldehida standar konsentrasi tertentu yang masing-masing telah dianalisis dengan kromatografi gas, kemudian dianalisis kembali dengan kromatograf gas, kemudian waktu retensi dan puncaknya dibandingkan.

Setelah dilakukan oprimasi dan penentuan selektivitas, selanjutnya dilakukan uji validasi lain, meliputi penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi, penentuan linieritas serta penentuan presisi dan akurasi terhadap larutan asetaldehida standar berbagai konsentrasi yang baru dibuat .

Selanjutnya distilat sampel yang diperoleh (sebanyak 8 distilat) dianalisis dengan kromatograf gas untuk penentuan kadar asetaldehida dalam sampel sirup fruktosa tersebut.

4.5 Analisis data

4.5.1 Penentuan selektivitas dan optimasi

Penentuan selektivitas dilakukan dengan cara membandingkan waktu retensi yang diperoleh dari larutan standar dan distilat sampel dengan rumus :

$$\alpha = t_{r1} / t_{r2}$$

di mana t_{r1} adalah waktu retensi puncak 1 dan t_{r2} adalah waktu retensi puncak 2.

Optimasi terhadap suhu awal kolom dilakukan dengan cara menghitung resolusi (daya pisah) yang dihasilkan oleh puncak asetaldehida dan puncak terdekatnya

$$R = 2d / w_1 + w_2$$

di mana R adalah resolusi, d adalah selisih waktu retensi dua puncak yang berdekatan, w_1 adalah lebar puncak 1, w_2 adalah lebar puncak 2.

Karena satuan d adalah menit sedangkan satuan w adalah mm, maka satuan d tersebut harus dikonversikan ke dalam satuan mm dengan memperhitungkan kecepatan kertas ("*chart speed*") yang digunakan, yaitu dalam satuan cm/menit.

4.5.2 Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi

Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi dilakukan dengan cara menyuntikkan pelarut blanko (aquabidest) sebanyak 1 μ l, dan mengatur parameter "zero", atenuasi ("*attenuation*"), "*area reject*", dan "*threshold*" pada integrator, pada posisi nol sehingga diharapkan semua

"noise" akan muncul. Sedangkan "*peak width*" dan "*chart speed*" tetap pada posisi operasional.

Dari hasil kromatogram blanko yang diperoleh, dicari fluktuasi puncak (jarak puncak tertinggi dan terendah) yang terbesar pada daerah 20 x lebar puncak atau lebar setengah puncak, yang disebut sebagai N_{p-p} ("noise" puncak ke puncak). Harga N_{p-p} ini kemudian dibagi dengan 5 sehingga diperoleh harga S_B yang merupakan standar deviasi rata-rata dari kromatogram blanko tersebut. Selanjutnya harga S_B ini dikalikan dengan 3 untuk penentuan batas deteksi, atau 10 untuk penentuan batas kuantitasi. Nilai akhir tersebut kemudian dikonversikan ke dalam satuan konsentrasi dengan membaginya dengan "*slope*" (S_i) yang menyatakan hubungan antara respon detektor (y) dengan konsentrasi (X), di mana dalam kurva regresi $y = a + bx$, "*slope*" tersebut sama dengan nilai " b ". Nilai " b " atau "*slope*" ini ditentukan dengan cara menyuntikkan larutan asetaldehida pada konsentrasi sekitar 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm, serta 10 ppm (x), kemudian mengukur tinggi puncak yang dihasilkan sebagai respon detektor (y). Karena distilat yang disuntikkan sebanyak 1 μ l, berarti dalam 1 μ l tersebut terdapat sekitar 0,5 ng, 1 ng, 5 ng, serta 10 ng asetaldehida.

Dengan demikian akan diperoleh batas deteksi dan batas kuantitasi dalam satuan konsentrasi ng/ μ l atau ppm ("*part per million*"), yaitu satu bagian asetaldehida dalam sejuta bagian volume larutan.

4.5.3 Penentuan linieritas

Penentuan linieritas dilakukan dengan membuat kurva baku atau kurva kalibrasi dengan cara menyuntikkan larutan standar dengan konsentrasi sekitar 5 ppm, 25 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, dan 1.000 ppm ke dalam kromatograf gas.

Perhitungan linieritas dilakukan dengan statistik analisis varian dan estimasi kurva regresi yang diperoleh.

4.5.4 Penentuan akurasi dan presisi

Penentuan akurasi dilakukan dengan menggunakan cara ke tiga dari Green (1996), yaitu dengan penentuan persen rekovery (perolehan kembali) dari larutan asetaldehida standar yang didistilasi. Akurasi dinyatakan baik untuk rekovery $100 \% \pm 10$ atau $90 - 110 \%$ (Green, 1996) dan harga t-hitung pada uji-t satu sampel lebih kecil daripada harga t-tabel (Miller, 1988)

Perhitungan rekovery ini dilakukan dengan rumus :

$$\frac{\text{konsentrasi distilat asetaldehida} \times 100\%}{\text{konsentrasi mula-mula}}$$

Hasil persen rekovery tersebut kemudian diuji dengan uji-t satu sampel untuk mengetahui apakah akurasi yang diperoleh memenuhi syarat atau tidak. Akurasi yang baik memiliki persen rekovery sebesar $100 \% \pm 10$ atau $90 - 110 \%$ (Green, 1986) dan harga t-hitung lebih kecil daripada t-tabel

Penentuan presisi dilakukan dengan menghitung koefisien variasi (KV) atau "*relative standard deviation*" (RSD) dengan rumus :

$$KV = S_D / \bar{X}$$

di mana S_D adalah standar deviasi relatif dan \bar{X} adalah harga rata-rata yang diperoleh dari tiga kali pengukuran.

Harga KV untuk analisis runut harus lebih kecil daripada 10 % (Soemadi, 1994, Buick, et al, 1990).

Pengujian presisi juga dapat dilakukan dengan menggunakan uji beda dua varian (uji F), di mana F hitung harus lebih kecil daripada F tabel (Miller, 1988)

4.5.5 Penentuan kadar asetaldehida dalam sirup

Konsentrasi asetaldehida dalam sirup ditentukan berdasarkan kurva regresi $y = a+bx$, di mana y adalah luas area yang diperoleh dari hasil penyuntikan (respon detektor) dan x adalah konsentrasi asetaldehida dalam distilat

Karena konsentrasi asetaldehida yang diperoleh adalah dalam satuan ppm ($\mu\text{g/ml}$) berarti dalam 1 ml distilat terdapat x μg asetaldehida. Jika bobot sirup yang ditimbang adalah a gram, maka kadar asetaldehida dalam sirup adalah $x/a \mu\text{g/g}$

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Penentuan selektivitas dan optimasi suhu

Penentuan selektivitas dilakukan dengan membandingkan waktu retensi asetaldehida (t_{r1}) dan metanol (t_{r2}) standar pada berbagai variasi suhu awal kolom dengan waktu retensi asetaldehida dan puncak terdekat yang berada dalam distilat sampel seperti pada tabel 5.1 dan tabel 5.2 berikut

Tabel 5.1 Data waktu retensi asetaldehida dan metanol standar pada suhu awal kolom kromatograf gas sebesar 50°C, 45°C, 40°C, dan 35°C

	Suhu 50 °C		Suhu 45 °C		Suhu 40 °C		Suhu 35°C	
	t_{r1}	t_{r2}	t_{r1}	t_{r2}	t_{r1}	t_{r2}	t_{r1}	t_{r2}
1	2,58	3,35	2,67	3,71	2,77	4,01	2,82	4,37
2	2,57	3,34	2,68	3,66	2,76	3,98	2,83	4,38
3	2,58	3,35	2,63	37,6	2,79	4,02	2,89	4,39
t_r	2,58	3,35	2,66	3,68	2,77	4,00	2,85	4,38
SD	0,006	0,006	0,03	0,03	0,02	0,02	0,04	0,01
KV	0,22	0,58	0,99	0,72	0,55	0,52	1,33	0,23

Tabel 5.2 Data waktu retensi puncak asetaldehida dan puncak terdekat dalam distilat sampel pada suhu awal kolom kromatograf gas sebesar 50°C, 45°C, 40°C, dan 35°C

	Suhu 50 °C		Suhu 45 °C		Suhu 40 °C		Suhu 35°C	
	t_{r1}	t_{r2}	t_{r1}	t_{r2}	t_{r1}	t_{r2}	t_{r1}	t_{r2}
1	2,59	3,35	2,66	3,66	2,76	3,98	2,88	4,37
2	2,59	3,35	2,67	3,65	2,75	4,01	2,89	4,38
3	2,60	3,38	2,68	3,72	2,76	3,99	2,81	4,38
t_r	2,59	3,36	2,67	3,68	2,76	4,00	2,86	4,38
SD	0,006	0,02	0,01	0,04	0,006	0,02	0,04	0,006
KV	0,22	0,52	0,37	1,03	0,22	0,38	1,40	0,13

Dari data pada tabel 5.1 dan 5.2 tersebut dapat dilihat bahwa waktu retensi puncak yang paling dekat dengan puncak asetaldehida dalam distilat sampel adalah mirip dengan waktu retensi puncak metanol. Data

hasil perhitungan selektivitas (α) dan resolusi (R) tersebut dapat dilihat pada tabel 5.3

Tabel 5.3 Data hasil perhitungan selektivitas dan resolusi untuk optimasi suhu awal kolom

	Suhu 50 °C		suhu 45°C		Suhu 40 °C		Suhu 35°C	
	α	R	α	R	α	R	α	R
Standar	1,30	2,26	1,39	2,60	1,45	3,10	1,55	3,88
	1,29	2,23	1,37	2,45	1,44	3,05	1,55	3,44
	1,30	2,26	1,40	2,60	1,44	3,08	1,52	3,75
Rata-rata	1,30	2,25	1,39	2,55	1,44	3,08	1,54	3,69
S_D	0,006	0,02	0,02	0,09	0,006	0,03	0,02	0,23
KV	0,45	0,77	1,10	3,40	0,40	0,82	1,12	6,23
Sampel	1,29	2,17	1,38	2,50	1,44	3,08	1,52	3,73
	1,29	2,17	1,37	2,45	1,45	3,15	1,52	3,73
	1,30	2,23	1,39	2,60	1,46	3,08	1,56	3,49
Rata-rata	1,29	2,19	1,38	2,52	1,45	3,10	1,53	3,65
S_D	0,006	0,03	0,01	0,08	0,01	0,04	0,02	0,14
KV	0,45	1,58	0,72	3,03	0,69	1,30	1,51	3,80

Dari data di atas terlihat bahwa perbandingan harga α sampel terhadap standar untuk suhu 50 °C adalah sebesar 0,99, untuk suhu 45°C sebesar 0,99, untuk suhu 40°C sebesar 1,01, dan untuk suhu 35 °C sebesar 0,99. Urutan harga R rata-rata mulai dari yang tertinggi sampai terendah adalah pada suhu awal kolom 35 °C, 40 °C, 45°C, dan 50°C. Namun dengan pertimbangan efisiensi waktu dipilih suhu awal kolom 40 °C untuk operasi selanjutnya.

Data kromatogram untuk penentuan selektivitas dan optimasi suhu awal kolom tersebut dapat dilihat pada lampiran 1a dan 1 b. Sedangkan data kondisi kromatograf gas yang digunakan untuk operasi selanjutnya dapat dilihat pada lampiran 2

5.2 Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi

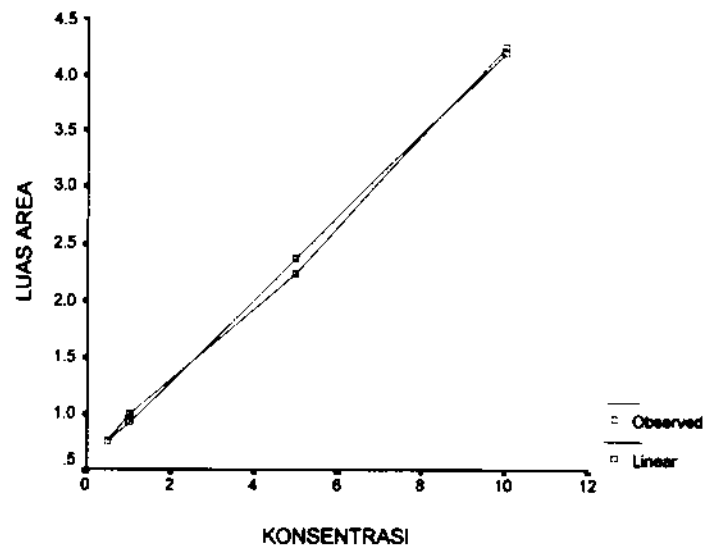
Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi dilakukan dengan cara menyuntikkan kromatogram blanko pada kondisi atenuasi, "*area reject*", dan "*treshold*" sebesar nol dan mengukur fluktuasi dari "*noise*" yang dilambangkan dengan notasi N_{p-p} .

Dari data kromatogram blanko tersebut diperoleh harga N_{p-p} rata-rata sebesar 1,5. Harga ini dibagi 5 sehingga diperoleh harga standar deviasi blanko (S_B) rata-rata sebesar 0,3.

Untuk penentuan "*slope*" maka disuntikkan larutan asetaldehida standar konsentrasi rendah yang diperoleh dari pengenceran larutan 100 ppm (0,010 g/100 ml) sebesar sepuluh kali, dua puluh kali, seratus kali, dan dua ratus kali, untuk pembuatan kurva regresi tinggi puncak terhadap konsentrasi. Konsentrasi larutan yang diperoleh adalah 10,00 ppm, 5,00 ppm, 1,00 ppm, dan 0,50 ppm. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada tabel 5.4, kurva regresi dapat dilihat pada gambar 5.1, kromatogram blanko pada gambar 5.2, sedangkan analisis regresi dalam bentuk analisis varian dapat dilihat pada lampiran 3.

Tabel 5.4 Data kromatogram tinggi puncak rata-rata (y) versus konsentrasi (x)

Konsentrasi (ppm)	Tinggi puncak (mm)
0,50	0,75
1,00	1,00
5,00	2,25
10,00	4,25



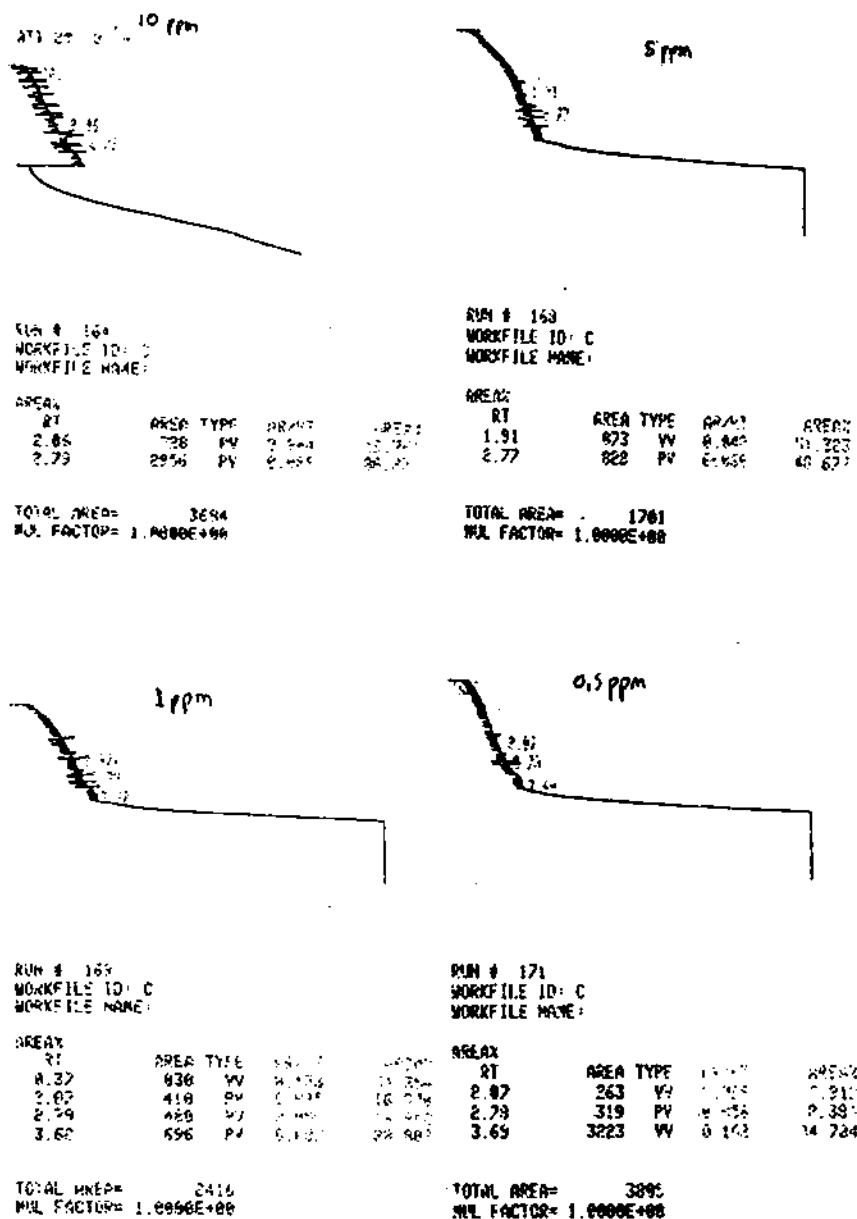
Gambar 5.1 Kurva tinggi puncak asetaldehida standar terhadap konsentrasi

Berdasarkan hasil analisis varian diperoleh harga a ("intersep") sebesar 0,57 dan b ("slope") sebesar 0,36, sehingga persamaan garis regresinya menjadi $Y = 0,57 + 0,36 X$. dengan koefisien korelasi r sebesar 0,9984 .

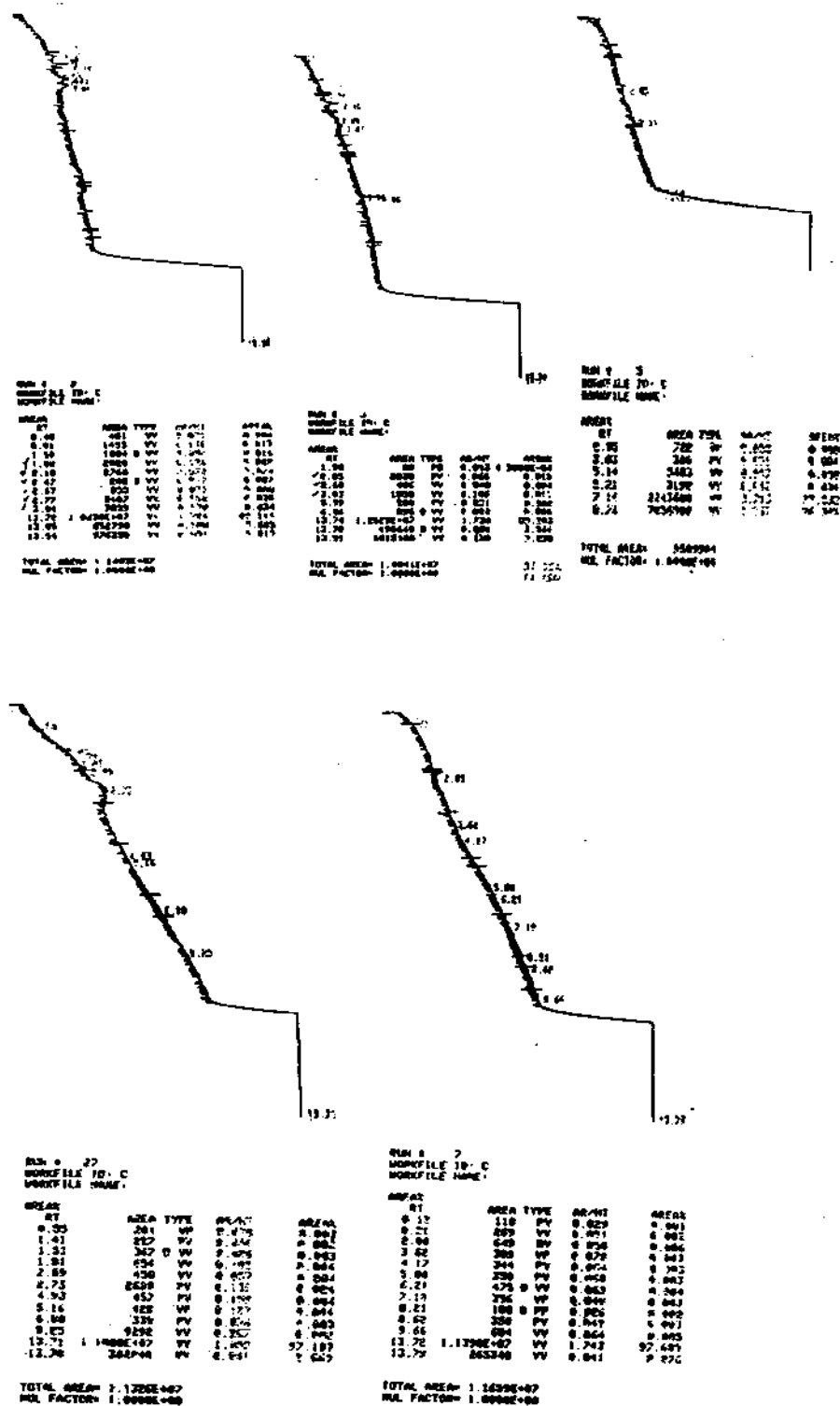
Harga S_B yang telah diperoleh dibagi dengan harga "slope" tersebut sehingga diperoleh harga sebesar 0,83. Selanjutnya angka ini dikalikan 3 untuk penentuan batas deteksi, dan sepuluh untuk penentuan batas kuantitasi, sesuai dengan rumus $Q = k \times S_B / S_I$ (Indrajanto, 1995, Carl, Warlich, 1990).

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut diperoleh harga/nilai batas deteksi sebesar 2,50 ng/ μ l dan batas kuantitasi sebesar 8,33 ng/ μ l. Dengan demikian, puncak yang dihasilkan oleh larutan asetaldehida pada konsentrasi di atas 2,50 ng/ μ l (2,50 ppm) diyakini sebagai puncak asetaldehida, dan bukan puncak dari "noise" .

Kromatogram hasil penyuntikan larutan standar konsentrasi rendah untuk penentuan "*slope*" dapat dilihat pada gambar 5.2 sedangkan kromatogram blanko dapat dilihat pada gambar 5.3



Gambar 5.2 Kromatogram asetaldehida konsentrasi rendah untuk penentuan "*slope*"



Gambar 5.3 Kromatogram blanko untuk penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi

5.3 Penentuan Linieritas

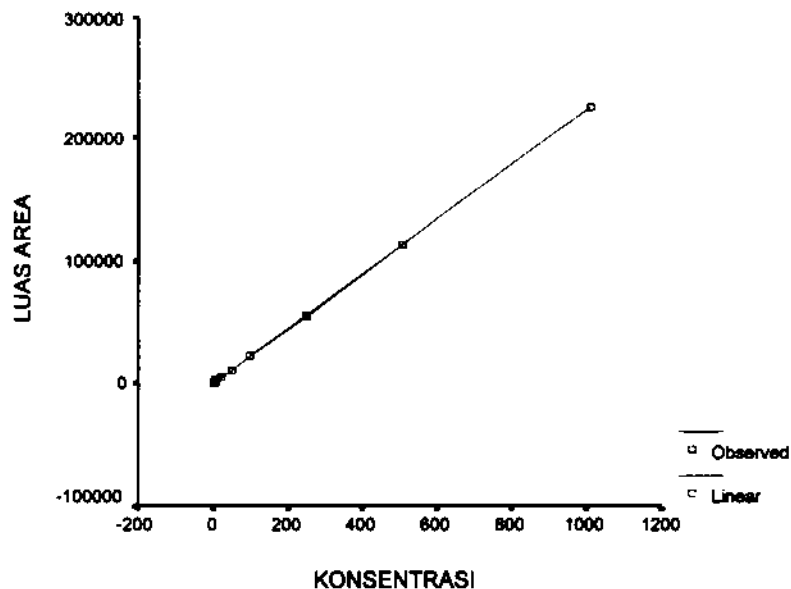
Untuk menentukan apakah konsentrasi asetaldehida yang berada dalam distilat sampel sirup fruktosa tersebut berada dalam rentang linier atau tidak, diperlukan kurva baku/ kurva kalibrasi yang dibuat dengan cara menyuntikkan larutan asetaldehida standar pada berbagai konsentrasi. Larutan-larutan tersebut diperoleh dari hasil pengenceran larutan asetaldehida standar pada konsentrasi 0,303 g/100 ml atau 3.030 ppm sebesar 3 kali, 6 kali, 12 kali, 30 kali, 60 kali, 120 kali, 300 kali, dan 600 kali. Konsentrasi yang diperoleh adalah 1.010 ppm, 505 ppm, 252,5 ppm, 101 ppm, 50,5 ppm, 25,25 ppm, 10,1 ppm, dan 5,05 ppm.

Data hasil pengamatan kromatogram luas area terhadap konsentrasi ditampilkan dalam tabel 5.5

Tabel 5.5 Data kromatogram luas area terhadap konsentrasi larutan asetaldehida standar

Konsentrasi (ppm) X	Luas Area			— y	Standar Deviasi SD	KV (%)
	y1	y2	y3			
5,05	1.302	1.329	1.379	1.336,67	39,07	4,66
10,10	2.471	2.956	2.691	2.706,00	242,84	8,97
25,25	5.554	5.419	5.071	5.348,00	249,20	4,66
50,50	11.581	11.453	11.367	11.457,00	110,98	0,97
101,00	22.263	23.354	23.443	23.020,00	657,09	2,85
252,50	56.756	53.268	56.829	55.617,67	2.035,20	3,66
505,00	113.570	113.520	113.640	113.576,67	60,29	0,05
1.010,00	225.350	228.860	221.610	225.273,33	3.625,61	1,61

Berdasarkan hasil analisis varian (lampiran 4) diperoleh kurva baku/ kurva kalibrasi linier dengan diagram pencar seperti terlihat pada gambar 5.2 dengan harga r sebesar 0,99998. Persamaan regresi yang diperoleh adalah $Y = 152,99 + 223,08 X$



Gambar 5.4 Kurva regresi luas area terhadap konsentrasi untuk perhitungan linieritas

Berdasarkan kurva regresi yang cenderung linier dan hasil analisis varian dengan harga r sebesar 0,99998, maka linieritas diperoleh pada rentang konsentrasi 5,05 ppm sampai 1.010,00 ppm

5.3 Penentuan akurasi dan presisi

Penentuan akurasi dilakukan dengan cara perhitungan persen rekoveri, yaitu konsentrasi asetaldehida yang diperoleh dari hasil distilasi dibagi dengan konsentrasi asetaldehida mula-mula, dikalikan 100 %.

Penentuan rekoveri hasil distilasi tersebut dilakukan terhadap larutan asetaldehida standar dengan konsentrasi 0,210 g/100ml, 0,207 g/100 ml, 0,197 g/100 ml, 0,415 g/100 ml, 0,398 g/100 ml, 0,401 g/100 ml, 1,010 g/100 ml, 0,996 g/100 ml, 0,988 g/100 ml atau 2,10 mg/ml, 2,07 mg/ml, 1,97 mg/ml, 4,15 mg/ml, 3,98 mg/ml, 4,01 mg/ml, 10,10 mg/ml, 10,08 mg/ml, 9,96 mg/ml yang masing-masing diencerkan

10,10 mg/ml, 10,08 mg/ml, 9,96 mg/ml yang masing-masing diencerkan sepuluh kali, sehingga konsentrasinya menjadi 0,210 mg/ml, 0,207 mg/ml, 0,197 mg/ml, 0,415 mg/ml, 0,398 mg/ml, 0,401 mg/ml, 1,010 mg/ml, 1,008, 0,996 mg/ml, 0,988 mg/ml atau 210 ppm, 207 ppm, 197 ppm, 415 ppm, 398 ppm, 401 ppm, 1.010 ppm, 996 ppm, dan 988 ppm. Hasil pengenceran ini kemudian diambil sebanyak 100 ml dan didistilasi dengan 100 ml aquabidest atau 100 ml campuran asam, sehingga konsentrasinya masing-masing menjadi 105 ppm, 104 ppm, 98 ppm, 208 ppm, 199 ppm, 200 ppm, 505 ppm, 498 ppm, 494 ppm (pembulatan ke satuan terdekat). Hasil distilasi ditampung dalam "*receiver*" berisi 1 ml air, kemudian dianalisis dengan kromatografi gas, dengan asumsi, semua asetaldehida yang berada dalam larutan terdistilasi seluruhnya. Jika volume hasil distilat dianggap tidak berubah (tetap 1 ml) konsentrasi larutan tersebut tetap sama seperti sebelum didistilasi. Dari 1 ml distilat tersebut diambil sebanyak 1 μ l dan disuntikkan ke dalam kromatograf gas. Konsentrasi yang diperoleh dari hasil penyuntikan distilat dibandingkan dengan konsentrasi mula-mula. Data hasil perbandingan konsentrasi dan perhitungan persen rekoverti dapat dilihat pada tabel 5.6

Tabel 5.6 Data perbandingan konsentrasi asetaldehida sebelum dan setelah distilasi untuk perhitungan persen rekoveri

Konsentrasi Mula-mula (ppm)	Konsentrasi setelah distilasi		Luas Area setelah distilasi		% Rekoveri	
	dengan air	dengan asam	dengan air	dengan asam	dengan air	dengan asam
505	280,02	241,51	62.622	54.029	55,45	47,82
498	274,84	240,42	61.465	53.787	55,19	48,28
494	271,44	238,09	60.706	53.268	54,95	48,20
208	109,82	91,56	24.652	20.579	52,80	44,02
200	109,20	90,72	24.516	20.391	54,60	45,36
199	108,58	89,42	24.375	20.102	54,56	44,93
105	53,52	49,85	12.093	11.274	50,97	47,48
104	53,00	49,32	11.977	11.156	50,96	47,42
98	52,50	48,19	11.866	10.904	53,57	49,17
x					53,67	46,96
KV					3,24	3,74

Berdasarkan tabel di atas diperoleh persen rekoveri rata-rata untuk hasil distilasi dengan air sebesar 53,57 % \pm 1,74 dan untuk hasil distilasi dengan asam sebesar 46,96 % \pm 1,76.

Data persen rekoveri yang diperoleh diuji dengan uji-t satu sampel untuk mengetahui akurasi metode yang digunakan, seperti terlihat pada lampiran 5 dan dengan uji t sepasang untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara hasil distilasi dengan air dan dengan asam, seperti terdapat pada lampiran 5.

Berdasarkan hasil uji-t satu sampel diperoleh harga [t] untuk distilasi dengan air adalah 79,95, sedangkan untuk distilasi dengan asam adalah 90,53. Padahal harga t tabel untuk derajat kebebasan 8 dan α sebesar 0,05 adalah 2,31. Berarti rekoveri hasil distilasi yang dilakukan, baik dengan air maupun dengan asam kurang memenuhi syarat. Dengan

demikian akurasi dari metode distilasi tersebut juga kurang memenuhi syarat .

Berdasarkan hasil uji-t sepasang diperoleh harga t sebesar 8,41, yang berarti ada beda yang cukup signifikan antara hasil distilasi dengan air dan dengan asam

Harga koefisien variasi rata-rata cukup baik, yaitu sebesar 3,24 % untuk hasil distilasi dengan air dan 3,74 % untuk hasil distilasi dengan asam.

Harga F hitung rata-rata sebesar 1,023. Sedangkan harga F tabel untuk derajat kebebasan pembilang dan penyebut masing-masing sebesar 8 [$F(8,8)$] dan α sebesar 0,05 adalah sebesar 4,433. Karena F hitung lebih kecil daripada F tabel, maka presisi dinyatakan cukup baik

5.4 Penetapan kadar asetaldehida dalam sirup fruktosa

Sesuai dengan perlakuan terhadap larutan standar, maka sampel sirup yang akan didistilasi diambil sebanyak 100 ml dan ditimbang lebih dahulu, kemudian baru didistilasi dengan 100 ml air atau 100 ml asam dengan waktu yang sama, yaitu sekitar 3 jam.

Sampel sirup tersebut dibagi menjadi dua grup, yaitu grup A untuk sirup yang akan didistilasi dengan air, dan grup B untuk sirup yang akan didistilasi dengan asam. Penimbangan dilakukan sebanyak empat kali untuk setiap grup, sehingga diperoleh 8 sampel.

Data hasil penimbangan sampel sirup tersebut dapat dilihat pada tabel 5.7.

Tabel 5.7 Data hasil penimbangan sampel sirup fruktosa

Jenis Sampel	Berat 100 ml sampel sirup fruktosa (g)			
	Sampel 1	Sampel 2	Sampel 3	Sampel 4
A	131,086	130,507	130,300	130,286
B	130,478	130,275	130,478	130,200

Berdasarkan data luas area yang terdapat pada lampiran 7 dan kurva baku yang diperoleh pada penentuan linieritas larutan standar, maka konsentrasi asetaldehida dalam distilat sampel yang disuntikkan ke dalam kromatograf gas dapat ditentukan seperti terlihat pada tabel 5.8

Tabel 5.8 Data konversi luas area (y) terhadap konsentrasi (x) asetaldehida dalam distilat sampel

	Sampel 1		Sampel 2		Sampel 3		Sampel 4	
	y	x (ppm)	y	x (ppm)	y	x (ppm)	y	x (ppm)
A	131.567	589,08	125.183	560,46	86.015	384,89	84.376	377,54
B	124.990	559,60	95.700	428,30	71.317	319,00	67.558	302,15

Berdasarkan data di atas, maka kadar asetaldehida dalam sampel sirup fruktosa hasil distilasi dengan air dan dengan asam dapat dilihat pada tabel 5.9

Tabel 5.9 Data hasil perhitungan kadar asetaldehida dalam sampel sirup fruktosa yang diteliti (A : hasil distilasi dengan air, B : hasil distilasi dengan asam)

Jenis Sampel	Kadar asetaldehida ($\mu\text{g/g}$)			
	Sampel 1	Sampel 2	Sampel 3	Sampel 4
A	449,38	429,45	295,39	289,78
B	428,89	328,77	244,49	232,07

Untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang cukup signifikan antara kadar asetaldehida dalam sampel sirup yang didistilasi dengan air dan dengan asam, dilakukan uji-t sepasang seperti pada lampiran 8

Harga t hitung yang diperoleh adalah sebesar 3,48, di mana harga tersebut lebih besar daripada harga t tabel, yaitu 3,18 untuk derajat kebebasan 3 dan α sebesar 0,05.

Hasil uji-t sepasang tersebut menunjukkan bahwa ada perbedaan yang cukup signifikan antara kadar asetaldehida dalam sampel sirup fruktosa yang didistilasi dengan air dan sampel sirup fruktosa yang didistilasi dengan asam di mana hasil distilasi dengan air menunjukkan kadar asetaldehida yang lebih tinggi. Hal ini sesuai dengan hasil pengujian terhadap kadar asetaldehida dalam larutan asetaldehida standar

BAB 6

PEMBAHASAN

Asetaldehida dihasilkan sebagai hasil antara pada proses fermentasi dari asam piruvat menjadi etanol. Sedangkan etanol umumnya selalu mengandung metanol.

Semula diasumsikan bahwa puncak terdekat setelah asetaldehida yang muncul dalam distilat sampel tersebut adalah puncak etanol. Namun setelah diuji ternyata waktu retensinya lebih kecil daripada waktu retensi etanol, dan puncak tersebut juga dihasilkan pada penyuntikan etanol standar. Oleh karena itu dilakukan pengujian terhadap waktu retensi metanol standar, dan kemudian terhadap waktu retensi campuran asetaldehida, metanol, serta etanol standar. Ternyata waktu retensi puncak ke dua tersebut mirip dengan waktu retensi metanol. Selain itu menurut Prave, et al., (1987), metanol tersebut dapat diasimilasi oleh bakteri dan ragi yang kemungkinan berada dalam sirup fruktosa tersebut.

Urutan elusi selain dipengaruhi oleh titik didih, juga dipengaruhi oleh gaya antar aksi dan koefisien partisi analit. Suatu analit akan tertahan lebih kuat oleh fase cair yang strukturnya mirip. Fase cair kolom kromatografi gas yang digunakan adalah "Carbowax" (*"Polyethylene Glykol"*) yang memiliki banyak gugus hidroksil. Dengan demikian, asetaldehida yang tidak memiliki gugus hidroksil akan terelusi paling awal. Metanol dan etanol sama-sama memiliki gugus hidroksil, namun karena jumlah atom C pada etanol lebih banyak, kemungkinan terjadinya ikatan hidrogen antara fase cair kolom dengan etanol lebih besar daripada antara

fase cair tersebut dengan metanol, sehingga etanol terelusi paling akhir. Asetaldehida mempunyai titik didih 20,8-21°C; metanol 61°C; dan etanol 78 °C, sehingga berdasarkan titik didihnya, puncak asetaldehida terelusi paling awal, disusul metanol, dan terakhir etanol. Dengan demikian penentuan selektivitas dan perhitungan resolusi dilakukan antara puncak asetaldehida dan puncak metanol sebagai puncak terdekat.

Optimasi dilakukan terhadap suhu kolom kromatograf gas karena pada kromatografi gas laju alir dan jenis kolom yang digunakan sudah tertentu. Semula telah dicoba menggunakan kolom HP-5 yang berisi 5 % "diphenyl" dan 95% "*dimethyl polysiloxane*" yang bersifat non *polar*, namun pada suhu kolom 35°C pada menit sekitar 0,83 sampai 0,86 sudah keluar puncak dan hanya ada satu puncak sekalipun pada distilat sampel. Karena itu digunakan kolom supelcowax yang bersifat polar sesuai dengan sifat analit yang akan diteliti (dalam hal ini asetaldehida).

Optimasi dilakukan terhadap standar maupun sampel dengan pemilihan suhu kolom 50°C, 45°C, 40°C, serta 35 °C. Berdasarkan hasil perhitungan resolusi (R) dan selektivitas (α) dipilih suhu kolom sebesar 40°C. Sebenarnya hasil perhitungan resolusi untuk suhu 35°C paling tinggi, namun dengan pertimbangan efisiensi waktu maka dipilih suhu kolom optimum sebesar 40°C untuk penetapan kadar asetaldehida dalam sampel.

Pemilihan waktu distilasi selama 3 jam dilakukan dengan pertimbangan bahwa pada saat melakukan distilasi terhadap asetaldehida standar murni (tanpa air) sebanyak 50 ml dalam waktu 10 menit hasil

distilat sudah tertampung dan baru berhenti mengalir setelah satu jam. Sedangkan terhadap distilasi sampel maupun asetaldehida standar yang diencerkan dengan air dan dengan asam walau telah dilakukan distilasi selama 6 sampai 8 jam tidak tampak perubahan kenaikan volum pada "receiver" yang berisi aquabidest tersebut, namun setelah dianalisis dengan kromatograf gas ternyata puncak dan luas area yang dihasilkan cukup tinggi. Hal yang sama terjadi untuk hasil distilasi selama tiga jam. Seharusnya dilakukan distilasi bertahap sampai semua asetaldehida yang mungkin berada dalam labu habis terdistilasi. Namun karena pelaksanaan distilasi dan analisis dengan kromatografi gas tidak dilakukan dalam waktu bersamaan maka peneliti tak dapat memperkirakan waktu yang diperlukan sehingga semua asetaldehida dalam larutan habis terdistilasi. Selain itu kondisi ruang tempat melakukan distilasi cukup panas sehingga walaupun dilakukan optimasi terhadap waktu distilasi belum tentu diperoleh hasil yang konsisten.

Pada penetapan batas deteksi dan batas kuantitasi diperoleh harga batas deteksi sebesar 2,50 ppm dan batas kuantitasi sebesar 8,33 ppm. Ini berarti jika kadar asetaldehida yang ditentukan lebih besar daripada 2,5 ppm maka dipastikan bahwa puncak yang dihasilkan tersebut adalah benar-benar puncak asetaldehida dan bukan puncak dari "noise".

Pada penentuan linieritas diperoleh kurva baku / kurva kalibrasi $Y = 152,99 + 223,08 X$ dengan harga r sebesar 0,99998. Berdasarkan gambar 5.4 dapat dikatakan bahwa kurva tersebut cenderung linier pada

rentang 5,05 ppm sampai 1.010 ppm. Dengan demikian dapat digunakan untuk asetaldehida dalam sampel pada batas konsentrasi tersebut.

Hasil perhitungan rekoveri dan analisis dengan uji-t satu sampel menunjukkan bahwa persen rekoveri yang diperoleh kurang memenuhi syarat. Ada tiga hal yang mungkin menjadi penyebab. Pertama, titik didih asetaldehida yang relatif rendah, yaitu sekitar 20,8 - 21 °C, padahal suhu ruang tempat melakukan distilasi paling rendah sekitar 29 °C. Dengan demikian walau kondisi sekitar peralatan distilasi sudah diupayakan dalam keadaan dingin, hilangnya asetaldehida pada saat melepaskan "*receiver*" tak mungkin dapat dihindari secepat apapun hal. itu dilakukan. Kemungkinan kedua adalah hilangnya asetaldehida terjadi pada selang waktu antara pengambilan distilat dengan siring mikro manual dan penyuntikan. Seperti telah dikemukakan sebelumnya, sebelum disuntikkan hasil distilat tersebut diletakkan dalam kotak yang dilapisi foam dan diisi dengan bongkahan es batu kemudian ditutup dengan aluminium foil. Walaupun ruang tempat kromatograf gas sudah dilengkapi dengan pendingin, namun pada siang hari suhu ruang tersebut tetap berada di atas suhu titik didih asetaldehida, sehingga memungkinkan terjadinya penguapan asetaldehida walau dalam jumlah relatif kecil. Kemungkinan ketiga adalah terjadinya salah pengamatan pada saat pengambilan distilat untuk disuntikkan. siring mikro yang digunakan bervolume 10 µl, sedangkan distilat yang disuntikkan sebanyak 1 µl, sehingga distilat yang disuntikkan tidak tepat 1 µl. Namun jika penyebabnya kemungkinan kedua dan ketiga tersebut maka seharusnya larutan standar yang disuntikkan

juga mengalami hal yang sama. Penyuntikan dengan volume melebihi 1 μ l sedapat mungkin dihindari karena pelarut yang digunakan adalah air, yang dapat mengakibatkan rusaknya kolom dan matinya detektor FID

Presisi yang diperoleh rata-rata cukup baik dengan harga koefisien variasi di bawah 10 % . Demikian pula analisis dengan uji-F menunjukkan harga F hitung yang lebih rendah daripada harga F tabel, yang berarti baik hasil distilasi dengan air maupun dengan asam cukup baik.

Analisis dengan uji-t sepasang terhadap distilat standar dan sampel menunjukkan bahwa ada perbedaan yang cukup signifikan antara hasil distilasi dengan air dan dengan asam.

Kadar asetaldehida yang terdapat dalam sampel sirup fruktosa yang diteliti cukup besar yaitu sekitar 288,78 ppm sampai 449,38 ppm untuk hasil distilasi dengan air dan 232,07 ppm sampai 428,89 ppm untuk hasil distilasi dengan asam. Karena distilasi terhadap satu sampel membutuhkan waktu sekitar tiga jam, tidak mungkin melakukan seluruh distilasi dalam waktu sehari. Dalam waktu sehari hanya mungkin dilakukan dua kali distilasi, yaitu satu kali dengan air dan satu kali dengan asam. Karena cukup banyak distilasi yang dilakukan, maka distilasi terhadap sampel dilakukan dalam selang waktu seminggu. Ada kecenderungan bahwa distilat sampel yang disimpan lebih lama menunjukkan adanya peningkatan kadar asetaldehida. Dengan demikian kemungkinan proses fermentasi terus berlangsung sekalipun dalam distilat. Sebaliknya, larutan asetaldehida standar yang tidak didistilasi menunjukkan kecenderungan menurunnya kadar. Namun hal ini memerlukan penelitian lebih lanjut.

BAB 7

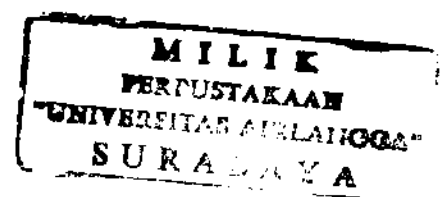
KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

- a. Suhu kolom yang optimal adalah suhu terprogram dengan suhu awal 40 °C selama 4 menit pertama dan kenaikan 40°C/menit sehingga mencapai suhu akhir 200 °C.
- b. Batas deteksi dan batas kuantitasi yang diperoleh dalam penelitian ini berturut-turut adalah 2,50 ng/μl (2,50 ppm) dan 8,33 ng/μl (8,33 ppm).
- c. Linieritas diperoleh pada konsentrasi 5,05 ppm sampai 1.010,00 ppm pada persamaan garis regresi $Y = 152,99 + 233,08 X$ dan koefisien korelasi r sebesar 0,99998
- d. Akurasi kurang memenuhi syarat. Persen rekoveri rata-rata hasil distilasi dengan air sebesar $53,67\% \pm 1,74$ dan hasil distilasi dengan asam sebesar $46,96\% \pm 1,76$ dengan harga t hitung lebih besar daripada t tabel.
- e. Presisi cukup baik. Koefisien variasi rata-rata 3,24 % dan 3,74 % berturut-turut untuk hasil distilasi dengan air dan dengan asam. Demikian pula harga F hitung lebih kecil daripada harga F tabel.
- f. Kadar asetaldehida dalam sirup hasil distilasi dengan air berkisar antara 289,78 μg/g sampai 449,38 μg/g, dan dalam sirup hasil distilasi dengan asam berkisar antara 232,07 μg/g sampai 428,89 μg/g. Hasil uji t - satu pasang menunjukkan perbedaan yang cukup signifikan dari kedua macam suasana distilasi tersebut.

7.2 Saran

- a. Jika dilakukan penelitian lanjutan untuk penetapan kadar asetaldehida dalam larutan, perlu dilakukan optimasi terhadap volume larutan yang didistilasi dalam waktu tertentu, atau optimasi terhadap waktu distilasi dengan menganalisis sisa larutan yang tidak terdistilasi untuk memperoleh persen rekovery yang lebih baik.
- b. Jika menggunakan sirup fruktosa sebagai sampel, perlu dilakukan uji mikrobiologis untuk mengetahui jenis mikroba yang ada sehingga senyawa hasil fermentasi maupun hasil antaranya dapat diperkirakan
- c. Karena titik didih asetaldehida relatif rendah, maka distilasi terhadap standar maupun sampel hendaknya dilakukan dalam ruang yang cukup dingin namun mempunyai ventilasi yang cukup baik mengingat sifat toksik asetaldehida tersebut. Demikian pula ruang tempat melakukan analisis dengan kromatografi gas sebaiknya diberi ventilasi yang cukup
- d. Siring mikro yang digunakan untuk penyuntikan zat-zat yang mudah menguap sebaiknya memiliki kapasitas volume yang lebih kecil sehingga lebih peka.
- e. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan menggunakan teknik preparasi dan metode lain, yang mungkin memberikan akurasi yang lebih tinggi.



DAFTAR PUSTAKA

- Bahl , Bahl, A., 1981, *Advanced Organic Chemistry*, S Chand & Company LTD, Ram Nagar, New Delhi
- Buick, A. R., et al, 1990, *Method validation in Bioanalytical Laboratory*. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis 8 : 629 - 637
- Carr, G.P, Wahlich, J.C,1990. *A Practical Approach to Method Validation in Pharmaceutical Analysis*. Jôurnal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis 8 : 613 – 618
- Clearly, J.P. 1986, *The NAD Deficiency Diseases*. Journal Orthomolecular Med., 1 : 164 – 174
- Day, J.R, Underwood A.L., 1991, *Quantitative Analysis* 6thed, Prentice Hall, New Jersey
- Debbrecht, F.J., 1985, *Qualitative and Quantitative Analysis by Gas Chromatography* (in Modern Practice of Chromatography Gas), pp 361-471
- Dreyfus, P.M, Victor, M, 1971. *Effects of Thiamine Deficiency on the Central Nervous System*. American Journal of Clin Nutr, 9: 414-425
- Dyson, N., 1990. *Chromatographic Integration Methods*. RSC Chromatography Monographs, Royal Society of Chemistry, UK
- Faith, Keyes, Clarck's, 1975, *Industrial Chemicals*, 4thed, A Wiley Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York
- Fifield, F.W., Kealey, D., 1995, *Principles and Practice of Analytical Chemistry* 4thed, Chapman & Hall, London
- Fritz, J. S., Schenk, G.H., 1987, *Quantitative Analytical Chemistry*, Prentice Hall, Inc. A Simon & Schuster Company, New Jersey
- Green,J. M, 1996, *A Practical Guide to Analytical Method Validation*. Analytical Chemistry 68 : 305 A – 309 A, American Chemical Society
- Grob, R.L., 1985, *Modern Practice of Gas Chromatography* 2nded, JohnWiley & Sons, Inc., New York

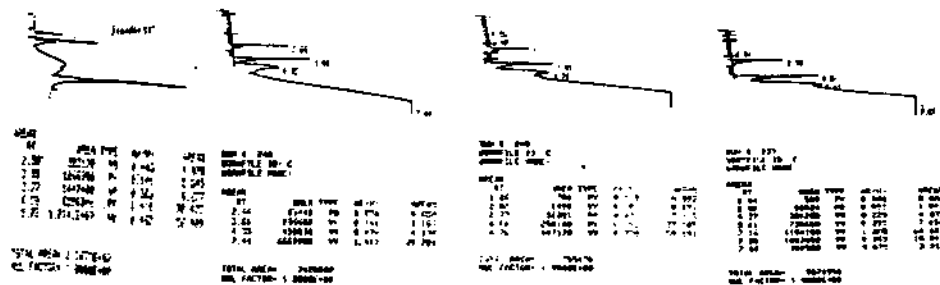
- Indrajanto, G, 1995, *Validasi Metoda pada Analisis dengan Kromatografi*.
Laboratorium Bioteknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas
Airlangga
- Levie, R., 1997, *Quantitative Chemical Analysis*, Mc Graw hill, New York
- Lund, E.D, Dinsmore, H.L., 1978., *Determination of Citrus Volatiles by
Headspace Analysis.*, U.S Citrus and Subtropical Products
Laboratory, Florida Southern College, Department of Chemistry
- Lund, E.D, Kirkland, C.L., Shaw, P.E., 1981. *Methanol, Ethanol, and
Acetaldehyde Contents of Citrus Products*. Journal Of Agricultural
and Food Chemistry, 29 : 361-366
- Mc Curry, P.M. Jr, n.d, *Acetaldehyde and Its Properties in Aqueous
Solutions of Carbohydrates*. A.E Staley Manufacturing Co.
- Mc Nair, H.M., Bonelli, E.J., 1988, *Dasar-dasar Chromatography Gas*, ITB
Bandung
- McGarrrity, M., Bauman, S., Lee, J., Lyne,A., Matyniak, N., Sakuma, S.,
Murphey, J, 1992. *Beer Volatiles by Headspace Gas
Chromatography*. American Society of Brewing Chemical, Methods
of Analysis, 5th ed, The Society, St. Paul, MN
- Miller, J.C., 1988, *Statistic for Analytical Chemistry* 2nded, John Wiley and
Sons, New York
- Munch, J.W., Munch, D.J., 1998. *Method Determination of Carbonyl
Compound in Drinking Water by Pentafluorobenzylhydroxylamine
derivation and Capillary Gas Chromatography with Electron
Capture Detention*, National Exposure Research Laboratory Office
of Research and Development ·U.S Environmental Protection
Agency
- Nijssen, B., Kamperman, T., and Jetten, J., 1996. *Acetaldehyde in Mineral
Water stored in Polyethylene Terephthalate (PET) Bottles : Odour
Threshold and Quantitation*. Packaging Technology and Science Vol
9 : 175 –185, John Wiley and Sons.
- Othmer, K. , 1978, *Encyclopedia of Chemical Technology*, 3rd ed vol.1,
John Wiley and Sons

- Othmer, K. , 1983, *Encyclopedia of Chemical Technology*, 3rd ed vol.22, John Wiley and Sons
- Philip, 1997, *Specifications HFS yang dibutuhkan oleh Coca Cola Indonesia / Coca Cola Amatil*. Carbonate Beverage Quality Control Manual-Vol 1, pp 1
- Prave, P., Faust, U., Sittig, W., Sukatsch, D.A., 1987. *Basic Biotechnology – A Student's Guide*, Akademische Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Soemadi, 1994, *Catatan Untuk Analisis Runut Guna mengendalikan Cemaran dan kontaminan Kimia*, makalah pada The Congress of Indonesian Chemical Society and International Symposium Chemindo, Surabaya
- South, J. A, 1997, *Acetaldehyde : A Common Potent Neurotoxin*. Vitamin Research Product, Inc., *Biotechnology and Bioengineering* 53 (1) : 71 – 78, John Wiley and Sons, Inc
- Sprince, H., et al, 1975, *Protective Action of Ascorbic acid and Sulfur Compounds against Acetaldehyde Toxicity; Implication in Alcoholism and Smoking Agent and Actions*, 5 : 144-173
- Sugaya, N., Nakagawa, T., Sakurai, K., Morita, M, Onodera, S., 2000., *Analysis of Aldehydes in Water by Headspace-GC/MS*, *Journal of Health Science* 47 (1), 21-27 (2001)
- Sumiyani, R. 1993, *Pengaruh Derivatisasi terhadap Parameter Kuantitatif Analisis Pestisida 2-Isopropilfenil N-Metil Karbamat dengan Metoda Kromatografi Gas*. **Tesis**. Universitas Airlangga Surabaya
- Tjokroadikoesoemo, S, 1986, *HFS dan Industri Ubi Kayu Lainnya*, Gramedia, Jakarta
- Tsuboi, K.K, et al, 1981, *Acetaldehyde Dependent Changes in Haemoglobine and Oxygen Affinity of Human Erythrocytes Haemoglobine*, 2 : 241 – 250
- Umbreit, G.R., 1985 *Trace Analysis :Special Consideration for Qualitative and Gas Chromatography (in Modern Practice of Chromatography Gas)*, pp 423-474

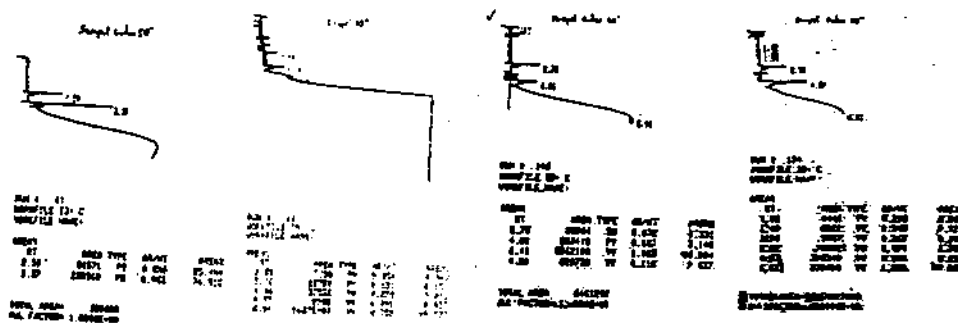
- USP XXII* (1990), United State Pharmacopial Convention Inc, 1989, pp 1710-1712
- USP XXIII* (1995), United State Pharmacopial Convention Inc, 1994, pp 1982-1984
- Vogel, A., 1968 *A Text Book of Practical Organic Chemistry* 3rded, Longmans, Green & Co LTD, London
- WHO, 1992, *Validation of Analytical Procedures used in the Examination of Pharmaceutical Materials*. WHO Technical Report Series No 823
- Williams, R.R, et al., 1942, *Induced Thiamin (vitamin B₁) Deficiency in Man*. Arch. Int. Med, 69 : 721 – 738
- Windholz M (ed), 1983, *The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biological*, 10thed, Merck & CO, Inc
- Zapzalis, C., Beck, A., 1986, *Food Chemistry and Nutritional Biochemistry*, Mc Millan Publishing Company, London

Lampiran 1a : Kromatogram untuk penentuan selektivitas dan optimasi suhu

Kromatogram campuran asetaldehida, metanol, dan etanol standar pada berbagai suhu (50°C, 45°C, 40°C, dan 35°C)

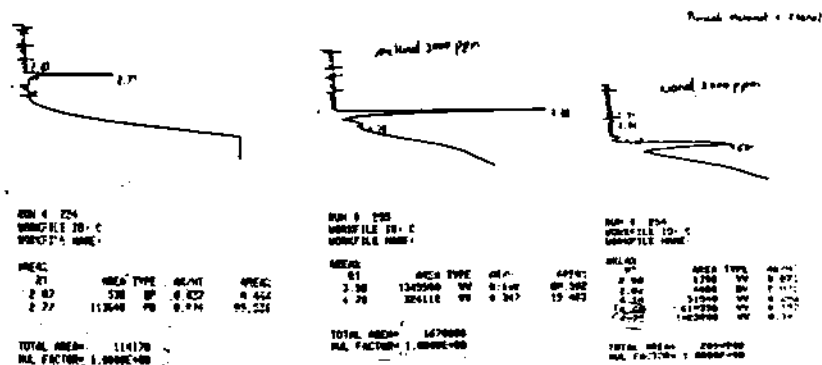


Kromatogram sampel pada berbagai variasi suhu

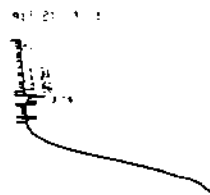


Kromatogram asetaldehida, metanol, dan etanol standar pada suhu

40°C



Lampiran 1b : Kromatogram pengujian kemurnian puncak asetaldehida pada suhu kolom 40°C

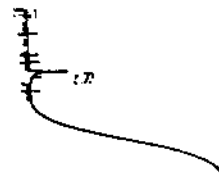


RUN 1 240
WORKFILE ID: C
WORKFILE NAME:

AREA#	RT	AREA TYPE	W%WT	AREA%
1	1.31	524	0.170	1.990
2	1.61	822	0.148	1.720
3	2.06	2604	0.147	4.104
4	2.79	44280	0.870	97.91

TOTAL AREA= 47710
CAL FACTOR= 1.0000E+00

asetaldehida standar



RUN 4 250
WORKFILE ID: C
WORKFILE NAME:

AREA#	RT	AREA TYPE	W%WT	AREA%
1	2.77	86711	0.872	100.000

TOTAL AREA= 86711
CAL FACTOR= 1.0000E+00

sampel x



RUN 8 252
WORKFILE ID: C
WORKFILE NAME:

AREA#	RT	AREA TYPE	W%WT	AREA%
1	1.42	759	0.150	1.775
2	1.79	1835	0.264	4.291
3	2.79	48168	0.850	93.934

TOTAL AREA= 42762
CAL FACTOR= 1.0000E+00

sampel x ditambah air



RUN 8 261
WORKFILE ID: C
WORKFILE NAME:

AREA#	RT	AREA TYPE	W%WT	AREA%
1	2.76	58289	0.872	100.000

TOTAL AREA= 58289
CAL FACTOR= 1.0000E+00

sampel x ditambah standar

Pada kromatogram di atas terlihat bahwa puncak asetaldehida standar dan puncak sampel sebelum dan setelah ditambahkan tetap satu puncak. Luas area puncak dalam sampel setelah penambahan asetaldehida standar berkurang karena konsentrasinya menjadi lebih encer, namun luas area tersebut lebih besar daripada luas area pada pengenceran sampel dengan air, sehingga puncak yang dihasilkan oleh sampel tersebut benar-benar puncak asetaldehida

Lampiran 2 : Kondisi kromatograf gas dan pengaturan parameter integrator yang digunakan dalam penelitian

Kromatograf gas yang digunakan adalah produksi Hewlett Packard tipe HP 5890 series II dengan kolom Fused Silica Supelcowax 10 yang memiliki diameter dalam 0,25 mm dan panjang 30 meter serta detektor "*Flame Ionization Detector*" (FID) dengan gas pembawa (carrier) nitrogen (N_2) dengan laju alir sekitar 1 ml/menit

Kondisi kromatograf gas yang digunakan dalam penelitian meliputi pengaturan suhu dan "*range*" sedangkan pengaturan parameter lain terdapat pada integrator.

1. Pengaturan parameter pada kromatograf gas

Suhu awal kolom (oven) diatur sebesar 40°C yang dipertahankan selama 4 menit sebelum dinaikkan dengan kecepatan 40°C/menit sehingga mencapai suhu akhir 200 °C. Sedangkan suhu detektor dan gerbang suntik (injektor) masing-masing diatur sebesar 200 °C.

2. Pengaturan parameter pada integrator HP 3392 A

Zero : 0

Attenuation : 4

Chart speed : 0,5 cm/menit

Peak width : 0.04 menit

Treshold : 1

Area reject : 1.000

Lampiran 3 : Analisis regresi untuk penentuan “slope” batas deteksi dan batas kuantitasi

Dependent variable.. Y

Method.. LINEAR

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R .99836
 R Square .99673
 Adjusted R Square .99509
 Standard Error .11204

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	7.6467676	7.6467676
Residuals	2	.0251074	.0125537

F = 609.12433 Signif F = .0016

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
X	.362513	.014688	.998362	24.680	.0016
(Constant)	.567132	.082520		6.873	.0205

Dari data di atas diperoleh persamaan regresi $y = 0,57 + 0,36 x$

Lampiran 4 : Analisis regresi dengan tabel analisis varian untuk penentuan linieritas

Variable.. Y Method.. LINEAR

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R .99998
R Square .99996
Adjusted R Square .99995
Standard Error 543.21187

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	43420947608.1	43420947608.1
Residuals	6	1770474.8	295079.1

F = 147150.18134 Signif F = .0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
X	223.084316	.581552	.999980	383.602	.0000
(Constant)	152.991327	239.108952		.640	.5459

Kurva regresi yang diperoleh adalah $Y = 152,99 + 223,08 X$

Lampiran 5 : Analisis hasil persen rekovery dengan uji-t satu sampel

% Rekovery hasil distilasi	
dengan air	dengan asam
55,45	47,82
55,19	48,28
54,95	48,20
52,80	44,02
54,60	45,36
54,56	44,93
50,97	47,48
50,96	47,42
53,57	49,17

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Hasil distilasi dengan air	9	53.6722	1.7384	.5795
Hasil distilasi dengan asam	9	46.9644	1.7575	.5858

One-Sample Test

	Test Value = 100					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Hasil distilasi dengan air	-79.951	8	.000	-46.3278	-47.6640	-44.9913
Hasil distilasi dengan asam	-90.531	8	.000	-53.0356	-54.3865	-51.6843

Harga [t] untuk distilasi dengan air adalah 79,95, sedangkan untuk distilasi dengan asam adalah 90,53. Harga t tabel untuk derajat kebebasan 8 dan α sebesar 0,05 adalah 2,31. Jadi t hitung lebih besar daripada t tabel. Berarti akurasi metode yang digunakan kurang memenuhi syarat.

Lampiran 6 : Analisis perbandingan % rekovert hasil distilasi dengan air dan hasil distilasi dengan asam dengan uji- t sepasang

Uji t sepasang ini untuk mengetahui apakah hasil distilasi dengan air dan dengan asam berbeda secara signifikan atau tidak.

Berdasarkan data pada lampiran 4 diperoleh hasil analisis sebagai berikut

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Hasil distilasi dengan air	53.6722	9	1.7384	.5795
	Hasil distilasi dengan asam	46.9644	9	1.7575	.5858

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Hasil distilasi dengan air & Hasil distilasi dengan asam	9	.062	.874

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Hasil destilasi dengan air - Hasil destilasi dengan asam	6.7078	2.3941	.7680	4.8675	8.5480	8.405	8	.000

Harga t hitung yang diperoleh adalah 8,41. Sedangkan harga t tabel sebesar 2,31. Karena t hitung lebih besar daripada t tabel, berarti ada perbedaan cukup signifikan antara hasil distilasi dengan air dan dengan asam

Lampiran 7 : Perhitungan luas area rata-rata untuk penetapan kadar asetaldehida dalam distilat sampel

Data luas area yang diperoleh dari hasil penyuntikan distilat sampel dapat dilihat pada tabel berikut

1. Hasil distilasi sampel dengan air

	Sampel 1A	Sampel 2 A	Sampel 3A	Sampel 4A
	LuasArea	LuasArea	LuasArea	Luas Area
y ₁	131.910	123.940	84.605	84.715
y ₂	130.070	124.570	86.163	84.790
y ₃	132.720	127.040	87,278	83.622
y	131.567	125.183	86.015	84.376
SD	1.357,95	1.638,49	1342,60	653,77
KV	1,03 %	1,31 %	1,16 %	0,77 %

2. Hasil distilasi sampel dengan asam

	Sampel 1B	Sampel 2B	Sampel 3B	Sampel 4B
	LuasArea	LuasArea	Luas Area	LuasArea
y ₁	124.280	96.404	70.832	67.287
y ₂	124.300	95.625	71.473	68.237
y ₃	126.390	95.072	71.646	67.151
y	124.990	95.700	71.317	67.558
SD	1.212,48	669,19	428,84	591,66
KV	0,97 %	0,70 %	0,60%	0,88 %

Kurva kalibrasi yang digunakan adalah kurva kalibrasi :

$$Y = 152,99 + 223,08 X \text{ dengan harga } r = 0,99998$$

Lampiran 8 : Analisis perbandingan kadar asetaldehida dalam sampel sirup fruktosa hasil distilasi dengan air dan dengan asam dengan uji-t sepasang

Untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang cukup signifikan antara kadar asetaldehida dalam sampel hasil distilasi dengan air dan dengan asam, dilakukan uji-t sepasang

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Hasil distilasi dengan air	366.0000	4	85.1927	42.5963
	Hasil distilasi dengan asam	308.5550	4	91.0008	45.5004

Paired Samples Correlations

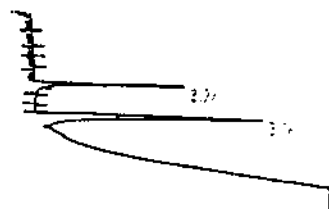
		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Hasil distilasi dengan air & Hasil distilasi dengan asam	4	.932	.068

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Hasil distilasi dengan air - Hasil distilasi dengan asam	57.4450	33.0547	16.5274	4.8478	110.0424	3.478	3	0.010

Berdasarkan hasil uji-t sepasang ini diperoleh harga t hitung sebesar 3,48. Sedangkan harga t tabel untuk derajat kebebasan 3 dan α sebesar 0,05, adalah 3,18. Dengan demikian ternyata ada perbedaan yang cukup signifikan antara kadar asetaldehida dalam sampel hasil distilasi dengan air dan dalam sampel hasil distilasi dengan asam.

Lampiran 9 : Kromatogram beberapa sampel yang digunakan dalam penelitian

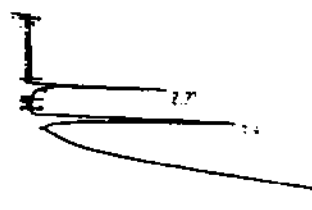


RUN: 1 93
WORKFILE ID: C
WORKFILE NAME:

RT	AREA	TYPE	AREA%	AREA
2.77	131918	PB	8.87%	28.92%
3.98	526858	PV	6.15%	79.97%

TOTAL AREA= 658776
NUL FACTOR= 1.0000E+00

Sampel I A

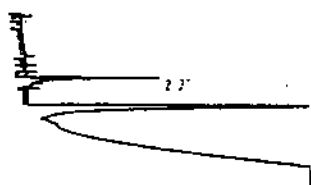


RUN: 1 91
WORKFILE ID: C
WORKFILE NAME:

RT	AREA	TYPE	AREA%	AREA
2.77	124298	PB	8.87%	28.21%
3.98	490670	PV	6.12%	71.79%

TOTAL AREA= 614958
NUL FACTOR= 1.0000E+00

Sampel I B

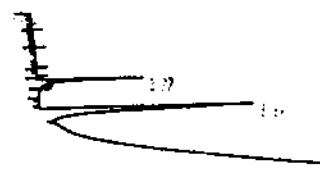


RUN: 1 87
WORKFILE ID: C
WORKFILE NAME:

RT	AREA	TYPE	AREA%	AREA
2.77	124578	PB	8.87%	28.21%
3.97	815694	PV	6.15%	84.73%

TOTAL AREA= 940256
NUL FACTOR= 1.0000E+00

Sampel II A



RUN: 1 89
WORKFILE ID: C
WORKFILE NAME:

RT	AREA	TYPE	AREA%	AREA
2.77	96484	PB	8.87%	17.48%
3.97	526358	PV	6.15%	84.52%

TOTAL AREA= 622758
NUL FACTOR= 1.0000E+00

Sampel II B

Lampiran 10 : Daftar tabel distribusi-t dan nilai kritis F

Table A.1 — The *t*-distribution

Value of <i>t</i> for a confidence interval of	90%	95%	98%	99%
Critical value of $ t $ for <i>P</i> values of	0.10	0.05	0.02	0.01
Number of degrees of freedom				
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

The critical values of $|t|$ are appropriate for a two-tailed test. For a one-tailed test the value is taken from the column for twice the desired *P*-value, e.g. for a one-tailed test, *P* = 0.05, 5 degrees of freedom, the critical value is read from the *P* = 0.10 column and is equal to 2.02.

Table A.3 — Critical values of *F* for a two-tailed test (*P* = 0.05)

ν_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	647.8	799.5	864.2	899.6	921.8	937.1	948.2	956.7	963.3	968.6	976.7	984.9	993.1
2	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33	39.36	39.37	39.39	39.40	39.41	39.43	39.45
3	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73	14.62	14.54	14.47	14.42	14.34	14.25	14.17
4	12.22	10.65	9.979	9.605	9.364	9.197	9.074	8.980	8.905	8.844	8.751	8.657	8.560
5	10.01	8.434	7.764	7.388	7.146	6.978	6.853	6.757	6.681	6.619	6.525	6.428	6.329
6	8.813	7.260	6.599	6.227	5.988	5.820	5.695	5.600	5.523	5.461	5.366	5.269	5.168
7	8.073	6.542	5.890	5.523	5.285	5.119	4.995	4.899	4.823	4.761	4.666	4.568	4.467
8	7.571	6.059	5.416	5.053	4.817	4.652	4.529	4.433	4.357	4.295	4.200	4.101	3.999
9	7.209	5.715	5.078	4.718	4.484	4.320	4.197	4.102	4.026	3.964	3.868	3.769	3.667
10	6.937	5.456	4.826	4.468	4.236	4.072	3.950	3.855	3.779	3.717	3.621	3.522	3.419
11	6.724	5.256	4.630	4.275	4.044	3.881	3.759	3.664	3.588	3.526	3.430	3.330	3.226
12	6.554	5.096	4.474	4.121	3.891	3.728	3.607	3.512	3.436	3.374	3.277	3.177	3.073
13	6.414	4.965	4.347	3.996	3.767	3.604	3.483	3.388	3.312	3.250	3.153	3.053	2.948
14	6.298	4.857	4.242	3.892	3.663	3.501	3.380	3.285	3.209	3.147	3.050	2.949	2.844
15	6.200	4.765	4.153	3.804	3.576	3.415	3.293	3.199	3.123	3.060	2.963	2.862	2.756
16	6.115	4.687	4.077	3.729	3.502	3.341	3.219	3.125	3.049	2.986	2.889	2.788	2.681
17	6.042	4.619	4.011	3.665	3.438	3.277	3.156	3.061	2.985	2.922	2.825	2.723	2.616
18	5.978	4.560	3.954	3.608	3.382	3.221	3.100	3.005	2.929	2.866	2.769	2.667	2.559
19	5.922	4.508	3.903	3.559	3.333	3.172	3.051	2.956	2.880	2.817	2.720	2.617	2.509
20	5.871	4.461	3.859	3.515	3.289	3.128	3.007	2.913	2.837	2.774	2.676	2.573	2.464

ν_1 = number of degrees of freedom of the numerator and ν_2 = number of degrees of freedom of the denominator

(dikutip dari "Statistic for Analytical Chemistry" by Miller, 1988)